

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

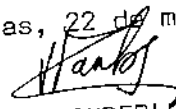
**Identificação de leveduras isoladas do Rio Una do Prelado, na Estação
Ecológica de Juréia-Itatins, SP.**

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por OLIVER ROBERTO SCHILLER e aprovada pela Comissão Julgadora em 22 de março de 1996.

Oliver Roberto Schiller

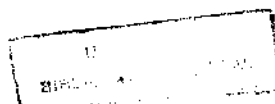
Campinas, 22 de março de 1996


PROF. DR. VANDERLEI PEREZ CANHOS
Presidente da Banca

Prof. Dr. Vanderlei Perez Canhos
Orientador

**Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos para a obtenção
de título de mestre em Ciência de Alimentos**

Campinas, S.P.
1996



UNIDADE	73C
N.º ORIENTAÇÃO	7/UNICAMP
N.º CPD	27530
N.º CPD	667196
N.º CPD	891100
DATA	26/04/96
N.º CPD	

CM-00086649-9

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

Sch33i

Schiller, Oliver Roberto

Identificação de leveduras isoladas do rio Una do Prelado, na
Estação Ecológica de Juréia Itatins, SP / Oliver Roberto Schiller
-- Campinas, SP [s.n], 1996.

Orientador: Vanderlei Perez Canhos
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

I. Levedos - Classificação. 2. * Coenzima-Q. 3. Água -
Microbiologia. I. Perez Canhos, Vanderlei. II. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.
III. Título.

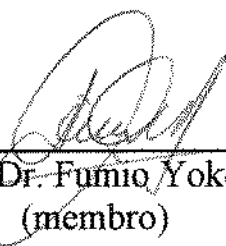
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Vanderlei Perez Canhos
(orientador)



Profa. Dra. Hélia Harumi Sato
(membro)



Prof. Dr. Fumio Yokoya
(membro)

Dra. Sílvia Yuko Eguchi
(membro)

Campinas, de março de 1996

Aos meus pais,
dedico

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Vanderlei Perez Canhos pela orientação e estímulo recebido durante o mestrado.

À Dra. Sílvia Yuko Eguchi pela co-orientação, paciência, incentivo, amizade e acompanhamento deste trabalho.

À Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia “André Tosello” que proporcionou todas condições necessárias para o desenvolvimento deste trabalho, assim como os seus pesquisadores e corpo técnico-administrativo.

Aos Profs. Fumyo e Lúcia pelas sugestões e convivência em laboratório.

À Capes pela concessão de bolsa.

Aos técnicos, estagiários da Coleção de Culturas Tropical pelo trabalho de liofilização das culturas

À Gisele M. Mecate Prada (Ms) e Mônica M. de Sillos Castro (Ms) pela “sub”-co-orientação deste trabalho.

Ao “povo” (Fátima e sua filha, Miro, Kleber e outros) do Microcentro pelo auxílio na elaboração deste trabalho e ao companheirismo nestes anos de convivência.

Aos funcionários da Biblioteca: Geraldo, Creusa, Toninho e outros pela colaboração e força.

À Cris e Telma pelos “quebra-galhos” na secretaria da pós. À Dna. Olívia, Jardete, Franceli, Marquinho e todos que de uma certa forma contribuíram para o andamento deste trabalho.

Ao Jonas e seus ajudantes, pela amizade, paciência e pelas cervejas perdidas por ele nas apostas de jogos de futebol.

Aos colegas da pós-graduação pela convivência, companheirismo e auxílio mútuo.

Aos colegas que participaram de alguma forma na elaboração deste trabalho.

Aos colegas de laboratório e Bar da Coxinha, etc....

E a todos aqueles que se sentirem esquecidos.

CONTEÚDO

CONTEÚDO	i
CONTEÚDO DAS TABELAS	iv
CONTEÚDO DAS FIGURAS	v
RESUMO	vi
SUMMARY	vii
1 - INTRODUÇÃO	1
2- REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 - Caracterização da Estação Ecológica de Juréia-Itatins	3
2.1.1 - Considerações gerais	3
2.1.2 - Localização da Estação Ecológica de Juréia-Itatins	4
2.1.3 - Condições climáticas	4
2.1.4 - Topografia da Estação Ecológica de Juréia-Itatins	5
2.1.5 - Cobertura vegetal	5
2.1.6 - Caracterização do solo	7
2.1.7 - Rede hidrográfica	7
2.2 - Ecologia de leveduras	10
2.2.1 - Leveduras associadas a ambientes aquáticos	14
2.3 - Leveduras: importância, definição e aspectos históricos de sua taxonomia	22
2.3.1 - Taxonomia convencional.	23
2.3.2 - Técnica de taxonomia molecular e quimiotaqueonomia	25
2.3.3 - Análise de quinonas: importância e importância na taxonomia	27
3 - MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1 - Localização e descrição dos locais de coleta	33
3.2 - Coleta das amostras	33
3.3 - Caracterização físico-química das amostras	34

3.4 - Origem das leveduras estudadas	34
3.5 - Identificação e taxonomia de leveduras	35
3.5.1 - Considerações gerais	35
3.5.2 - Características de reprodução vegetativa e crescimento em meio líquido	36
3.5.3 - Microcultivo	36
3.5.4 - Formação de balistosporos	37
3.5.5 - Características de Reprodução Sexuada	37
3.5.6 - Testes fisiológicos e bioquímicos	38
3.5.6.1 - Fermentação de carboidratos	38
3.5.6.2 - Testes empregando a técnica de “Replica Plate”	38
3.5.6.2.1 - Assimilação de compostos nitrogenados	40
3.5.6.2.2 - Crescimento em meio sem vitamina	40
3.5.6.2.3 - Osmotolerância a 50% de glicose e a 10% de NaCl	40
3.5.6.2.4 - Resistência à cicloheximida	40
3.5.6.2.5 - Crescimento a 37 ⁰ C	41
3.5.6.2.6 - Teste de Diazonium Blue B (DBB)	41
3.5.6.2.7 - Síntese de compostos amilóides	41
3.5.6.3 - Hidrólise de uréia	41
3.5.6.4 - Atividade de arbutina	42
3.5.6.5 - Produção de ácido	42
3.5.7 - Análise de coenzima-Q	42
3.5.7.1 - Procedimento	43
3.5.7.2 - Preparo da biomassa	43
3.5.7.3 - Isolamento e Purificação da Coenzima-Q	44
3.5.7.3.1 - Isolamento da Coenzima-Q	44
3.5.7.3.2 - Purificação da Coenzima-Q	45
3.5.7.3.3 - Identificação da Coenzima-Q	45
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4.1 - Área de amostragem e caracterização físico-químicas das amostras	46

4.2 - Identificação das leveduras em nível genérico	46
4.2.1 - Identificação das leveduras isoladas do rio	48
4.2.2 - Identificação das leveduras isoladas do mangue	49
4.2.3 - Identificação das leveduras isoladas do estuário	50
4.2.4 - Identificação das leveduras em nível genérico nos três pontos de coleta	51
4.3 - Identificação de leveduras em nível de espécie	53
4.3.1 - Identificação do gênero <i>Candida</i> em nível de espécie	53
4.3.2 - Leveduras pigmentadas	63
4.3.3 - Gêneros com características ascomicéticas	65
4.3.4 - Demais gêneros classificados em nível de espécie	66
4.4 - Considerações finais	68
5 - CONCLUSÕES	82
6 - REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS	84
APÊNDICE 1	96
APÊNDICE 2	98
APÊNDICE 3	100

CONTEÚDO DE TABELAS

TABELA 1: Pontos de amostragem no local de estudo e temperatura d'água	33
TABELA 2: Dados de coleta dos dias 02/11/1991 e 30/01/1992	34
TABELA 3: Dados fisico-químicos das amostras coletadas no rio Una do Prelado	46
TABELA 4: Total de leveduras coletadas nos pontos de amostragem	47
TABELA 5: Ocorrência, frequência e perfil de quinonas das espécies do gênero <i>Candida</i> ao longo do Rio Una do Prelado	54
TABELA 6: Espécies de leveduras isoladas nos três pontos de coleta	70
TABELA 7: Resultados dos exames morfológicos, fisiológicos e bioquímicos das leveduras isoladas	71
TABELA 8: Perfil de distribuição das diferentes coenzimas-Q no gênero <i>Candida</i>	81

CONTEÚDO DAS FIGURAS

FIGURA 1: Gêneros de leveduras isoladas na região do rio	48
FIGURA 2: Gêneros de leveduras isoladas do mangue	49
FIGURA 3: Gêneros de leveduras isoladas no estuário	50
FIGURA 4: Ocorrência das leveduras considerando-se os três pontos de coleta	51

Identificação de leveduras isoladas do Rio Una do Prelado, na Estação Ecológica de Juréia-Itatins, SP.

Resumo:

A microbiota de leveduras associada à água do Rio Una do Prelado da Estação Ecológica de Juréia-Itatins (Peruíbe-SP) foi estudada em três pontos distintos: rio, mangue e estuário. Foram isoladas linhagens de leveduras e fungos leveduriformes. Das leveduras isoladas, 91% do total se encontram no estado anamorfo, com característica de leveduras ascomicéticas (74%) e basidiomicéticas (26%). O gênero *Candida* foi o predominante nos três pontos de coleta, com frequência superior a 67%, seguidas em ordem decrescente por *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Cryptococcus*, *Williopsis*, *Khuyveromyces*, *Aureobasidium*, *Fellomyces*, *Zygosaccharomyces* e *Trichosporon*. O gênero *Candida* apresentou 21 espécies distintas, sendo o de maior diversidade. A análise de coenzima-Q foi utilizada com sucesso no agrupamento das espécies de *Candida* em complemento à taxonomia convencional. Três grupos distintos foram delineados no gênero *Candida* respectivamente com a predominância de coenzima Q-6, Q-7 e Q-9 na cadeia respiratória.

Identification of yeasts isolated from Una do Prelado River, Ecological Station of Juréia-Itatins (SP - Brazil).

Summary:

Yeasts and yeast-like fungi associated to water were studied in three different environments of the Una do Prelado River (Ecological Station of Juréia-Itatins, Peruíbe, SP - Brazil): freshwater, mangrove and estuary. Among the yeasts, 91% were in the anamorph state, of which 74% were ascomycetous and 26% basidiomycetous. Isolates of the genus *Candida* were predominant in all the environments studied (higher than 67%), followed by *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Cryptococcus*, *Williopsis*, *Kluyveromyces*, *Aureobasidium*, *Fellomyces*, *Zygosaccharomyces* and *Trichosporon*. Twenty-one species of *Candida* were identified, representing the highest diversity amongst the genera studied. Ubiquinone (Co-Q) analysis was carried on all *Candida* isolates complementing the morphological and biochemical identification. These isolates could be divided into 3 groups according to the predominant Coenzyme -Q type: Q-6, Q-7 and Q-9.

1- INTRODUÇÃO.

A Mata Atlântica é uma das principais formações florestais do nosso país, recobrando a fachada Atlântica da Serra do Mar. Foi a primeira floresta a sofrer exploração irracional, iniciada com a retirada do pau-brasil e sofrendo interferência do homem até os dias de hoje (CAPOBLANCO, 1987). Em 1974 com a implantação do Programa de Estações Ecológicas, visando conservar amostras representativas dos principais ecossistemas do País, alguns sistemas foram mantidos intactos (CARNEIRO DA PAIXÃO, 1984). A Mata Atlântica encontra-se reduzida a menos de 5% de sua cobertura original, no entanto possui uma vasta planície, restinga, manguezais, dunas e banhados. Apresenta uma biodiversidade de organismos endêmicos ainda não estudados, pois a floresta possui manchas verdes ainda intocadas pelo homem (CORTESÃO, 1989).

A preocupação com a preservação da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, iniciou-se na década de 70, quando foi levantada a idéia de se implantar uma usina nuclear no local (CARNEIRO DA PAIXÃO, 1984).

De um total de 15.000.000 espécies estimadas no inventário da biodiversidade mundial, apenas 69.000 são conhecidas, correspondendo apenas a 5% da totalidade (BULL et al, 1992). Para tentar recuperar uma pequena porcentagem que resta ainda neste inventário vem-se fazendo, em todo o mundo, inúmeras pesquisas, envolvendo estudos sobre a biodiversidade de plantas, animais e microrganismos, tanto em sistemas terrestres como aquáticos, buscando a compreensão do sistema como um todo aliado ao desenvolvimento de novos processos biotecnológicos (GOODFELLOW & O'DONNELL, 1992).

As leveduras são microrganismos unicelulares, amplamente distribuídos em água, solo e ar. Na água encontramos diferentes espécies de leveduras, tanto as autóctones como as alóctones. As alóctones, não são originárias do local em que habitam, mas provêm da lavagem do terreno, das folhas e vegetações vizinhas e oriundas da deposição de esporos do ar, trazidos pelo vento ou mesmo de detritos

de origem animal e humana. Algumas dessas espécies, em condições absolutamente naturais, se adaptam rapidamente ao novo ambiente aquático e se tornam população habitual, já outras podem alterar o equilíbrio médio entre as espécies causando um certo risco na diversidade. As espécies autóctones, originais do local onde se encontram, estão ligadas às condições dos espelhos da água em que se encontram, sofrendo variação com as alterações das temperaturas, porcentagem de oxigênio dissolvido, pH, grau de contaminação por esgotos e efluentes nas suas várias formas com às características físico-químicas do ambiente aquático. As autóctones se encontram em equilíbrio com espécies predominantes (PARDO, 1983).

Nota-se uma forte deficiência em estudos envolvendo diversidade de microrganismos em ambientes aquáticos, principalmente quando se trata dos grupos dos fungos filamentosos e unicelulares (YAMASATO et al., 1974).

As leveduras utilizadas no presente trabalho foram isoladas das águas do Rio Una do Prelado na Estação Ecológica de Juréia-Itatins, no Estado de São Paulo, com o seguinte objetivo:

- Classificar taxonomicamente leveduras isoladas da água,
- Distinguir entre linhagens alóctones e autóctones em ambiente aquático.

2 -REVISÃO DA LITERATURA.

2.1-Characterização da Estação Ecológica de Juréia-Itatins.

2.1.1 -Considerações gerais.

O Programa de Estações Ecológicas foi iniciado em 1970, visando conservar amostras representativas dos principais ecossistemas do Brasil, de modo a proporcionar o estudo entre esses ambientes e as áreas vizinhas ocupadas pelo homem. A preocupação com a preservação da Juréia iniciou-se na década de 70, quando foi cogitado em transformar o local em uma usina nuclear (CARNEIRO DA PAIXÃO, 1984).

Em São Paulo, a Mata Atlântica encontra-se reduzida a menos de 5% da cobertura original das áreas de conservação do Estado; a Estação Ecológica de Juréia consiste uma grande parte dessa Mata, contando com uma vasta planície, restinga, manguezais, dunas e banhados (ANÔNIMO, 1960).

Em 1979, dois anos após o tombamento da Juréia, a SEMA - Secretaria Especial do Meio Ambiente (Governo Federal) recebeu, através de um Contrato de Comodato assinado no dia 25 de julho, com os proprietários da região, o direito de torná-la uma Estação Ecológica (CAPOBIANCO, 1987).

A área destinada à Estação está protegida pelo Decreto Presidencial nº 84.771 (1980), que declara de utilidade pública uma parte do litoral paulista, em decorrência da implantação das Usinas Nucleares 4 e 5, do Programa Brasileiro de centrais Nucleares. Além disso, há o Decreto Presidencial nº 84.973 (1980) que dispõe sobre a co-localização das Estações Ecológicas e Usinas Nucleares. (CARNEIRO DA PAIXÃO, 1984). A Estação Ecológica da Juréia-Itatins foi criada pelo decreto nº24.646 de 20.01.1986, sendo sua lei promulgada sob o nº 5.649 em 1987 (ATTILI et al., 1995; CAPOBIANCO, 1987)

2.1.2 -Localização da Estação Ecológica de Juréia-Itatins.

A Estação Ecológica de Juréia-Itatins, possui uma área de 79.200 ha, está localizada no litoral sul do Estado de São Paulo, abrangendo as cidades de Peruíbe, Iguape, Itarari e Maracatu e situa entre os paralelos 24°18'47" e 24°36'10" de latitude sul e 47°00'00" e 47°30'07" de longitude oeste (LANGEANI FILHO, 1989; ATTILI et al., 1995).

2.1.3-Condições climáticas.

O clima dessa área caracteriza-se como tropical sub-quente, super-úmido, sem seca, com um índice pluviométrico podendo superar os 4.000 mm por ano, embora esteja envolvida pela isoietas de 1.750 mm (LANGEANI FILHO, 1989; ATTILI et al., 1995; CARNEIRO DA PAIXÃO, 1984). A média pluviométrica no período de fevereiro de 1991 a janeiro de 1994 foi de 3428 mm (ATTILI et al., 1995). Com relação à umidade relativa do ar, é possível observar que na maior parte dos meses, os índices permanecem na faixa dos 80% a 100% (ATTILI et al., 1995; CARNEIRO DA PAIXÃO, 1980).

As temperaturas médias situam-se ao redor de 22.7°C, com a média das mínimas em torno de 18°C e a das máximas em 29.9°C (CAPOBIANCO, 1987). Existe na Estação Ecológica de Juréia-Itatins um gradiente vertical de temperatura variando com a altitude, correspondendo em média a 1°C para cada 250 metros. Para estudar dados sobre o clima foi instalado um posto termopluviométrico no local pela Fundação Tropical de Pesquisa "André Tosello" (ATTILI et al., 1995).

2.1.4-Topografia da Estação Ecológica de Juréia-Itatins.

Entre as extensas formações quaternárias da Baixada do Ribeira, destaca-se um pontão rochoso (Ponta da Juréia) que avança para o mar, apresentando orientação predominante E-O. Mais ao norte, aparecem outros pontões (Ponta do Grajaúna e Ponta do Una) que se dispõem paralelamente à Ponta da Juréia interceptando as praias que se estendem até as proximidades de Peruibe. São elas a Praia do Rio Verde e a Praia do Una. (TARIFA et al., 1984; CARNEIRO DA PAIXÃO, 1984).

De acordo com o Mapa Geológico do Estado de São Paulo (I.G.G. 1974), esses três pontões, representam afloramento de *rochas pré-cambrianas e cristalofianas* sendo a Ponta da Juréia constituída de gnaisses e migmatitos. Para o interior, essas rochas se estendem formando amplo maciço que se encontra circundado pelas planícies do rio Una do Prelado e do rio Cumprido (a oeste), Rio Cacunduva, (ao norte) e Ribeirão Grajaúna (a leste) (TARIFA et al., 1983; CARNEIRO DA PAIXÃO, 1984).

As áreas montanhosas, com altitudes médias entre 400-600 metros e picos isolados que ultrapassam 800 metros, encontram-se circundadas por baixadas sedimentares quaternárias. As variações de topo e altitude são significativas, existindo compartimentos ao nível do mar, enquanto outros estão alçados a mais de 600 metros (TARIFA et al., 1984).

2.1.5-Cobertura vegetal.

Na área compreendida pela Juréia pode-se distinguir várias formações vegetais que se individualizam fisionomicamente, floristicamente e até mesmo quanto a sua localização geográfica (LANGEANI FILHO, 1989)

Assim sendo, podemos encontrar grandes porções da Mata recobrando as diversas formações montanhosas: jundú nas grandes planícies de restingas,

manguezais na Foz do Rio Una e do Rio Verde e vegetação de altitude no topo do maciço da Juréia (CAPOBIANCO, 1987).

Neste local estão representados os principais ecossistemas existentes no litoral paulista, antes da intensa especulação imobiliária ocorrida ao longo do litoral paulista. Estes diferentes ecossistemas são o resultado das complexas inter-relações existentes entre os seres vivos e seu ambiente. Os diferentes ecossistemas se encontram submetidos ao mesmo clima e refletem as condições do substrato sobre o qual se desenvolvem. Portanto, na planície de restinga, constituída por sedimentos arenosos de formação recente, pode-se notar com clareza a existência de um gradiente crescente de biomassa e diversidade vegetal no sentido praia interior. Essa diferença corresponde à progressiva melhoria da qualidade do solo, decorrente da constante incorporação de húmus e da atenuação dos efeitos resultantes da proximidade com o oceano (CAPOBIANCO, 1987; LANGEANI FILHO, 1989).

A Mata Tropical é a formação que caracteriza a área da Estação Ecológica estendendo-se por toda a região serrana, pré-serrana e baixada. Constituída por indivíduos de porte arbóreo bem desenvolvidos, trata-se de uma mata bem estratificada. A mata é do tipo pluvial, caracterizada como a floresta que recobre as Encostas da Serra do Mar, apresentando-se alta, latifoliada, sempre-verde, tropical úmida, pertencente a subsérie florestal Driática, Mesofítica e Higrofitica (LANGEANI FILHO, 1989). A vegetação é densa na sua base e à medida que a declividade aumenta surgem árvores de menor porte. Na parte superior do maciço ocorre uma substituição paulatina da formação arbórea pela arbustiva. No topo do maciço ocorre os chamados campos de altitude, caracterizados pela predominância de vegetação rasteira (CAPOBIANCO, 1987).

A mata que recobre Juréia-Itatins foi classificada desta forma como Floresta Tropical Latifoliada Perenifolia Tropical Úmida de Encosta. Essa Mata da planície litorânea forma um contínuo com a Mata Atlântica que recobre a serra dos Itatins, o maciço da Juréia e outras elevações que aparecem na região. Essa floresta, que se desenvolve sobre solos originados de rochas do maciço cristalino, apresenta

uma exuberância muito maior, com um dossel que chega a atingir 18 metros de altura. Sob essa cobertura contínua podem ser distinguidos pelo menos dois outros extratos: um constituído por espécies arbóreas de alturas entre 5 e 8 metros e outro formado por arbustos e herbáceas de menor porte. É notável a presença de pteridófitas e palmeiras, como o palmito, e a abundância de epífitas como bromélias e orquídeas que recobrem grandes porções dos ramos das árvores (CAPOBIANCO, 1987). O extrato arbóreo é dominado por mirtáceas, rubiáceas, leguminosas e melastomatáceas. Dentre as árvores de importante valor econômico encontra-se o *Jacarandá sp*, *Tabebuia sp*, *Ocotea sp*, *Dalbergia sp*, *Ormosia sp* e *Euterpes edulis* (palmito) (CAPOBIANCO, 1987; LANGEANI FILHO, 1989).

2.1.6- Caracterização do solo.

Amostras de solo coletados e analisados pelo Instituto Agrônomo de Campinas nas regiões de mata e mangue da Estação Ecológica, fornecem os seguintes resultados: o solo de mata é fortemente ácido (pH 4,5), moderadamente rico em matéria orgânica (3,7%) e com 2,0 meq/100 mL de Al^{+++} , 0,3 meq/100 mL de Ca^{++} , 0,2 meq/100 mL de Mg^{++} , 40 mg/mL e K e 4,1 mg/mL de P, portanto sem grande riqueza nutricional. O solo de mangue é ácido (pH 5,0) contendo 3,9% de matéria orgânica 0,1 meq/100 mL de Al^{+++} , e 0,9 meq/100 mL de Ca^{++} , 2,0 meq/100 mL de Mg^{++} , 176 mg/mL de K e 5,1 mg/mL de P; portanto o estado nutricional do solo de mangue é significativamente maior que o da mata (CARNEIRO DA PAIXÃO, 1984).

2.1.7- Rede hidrográfica.

A planície Costeira Sul-Paulista é uma região bem diferenciada ocupando quase um décimo da área do Estado de São Paulo. Constitui a parte baixa da Fachada Atlântica que termina na Serra do Mar. Na interface entre a Baixada e a

Serra há uma Região Pré-Serrana na qual se acomodam as diversas bacias de captação dos vales fluviais até se expandir na Baixada inferior, em estuários que se abrem para o mar. Dentro da Baixada, há 2 áreas: o litoral arenoso, ou lamacento, de restingas ou banhados, e o distal com aluviões continentais. Toda a região é dominada pelas águas, não só dos numerosos rios que a atravessam, mas dos canais lagunares que são braços de mar separando ilhas como as de Cananéia e Ilha Comprida formando em conjunto um ambiente estuarino-lagunar. O regime hidrológico é caracterizado pelas altas precipitações bem distribuídas ao longo do ano e carecendo de verdadeiros períodos de seca com déficit hídrico. Existe uma grande quantidade de pequenos cursos de águas superficiais formadores de rios de pequeno porte, apenas coletores de águas superficiais; são os de baixada, que nascem em banhados ou esteiros ou em lagoas inter-restingas. Devido à pequena declividade das baixadas, suas águas são pouco movimentadas. Os dois maiores rios desta categoria são os rios Una da Aldeia e Una do Prelado, que têm suas nascentes no Banhado Grande. O primeiro inflete para NE atravessa a Juréia e, após um percurso de 60 km, deságua no Mar enquanto que o segundo se dirige para a direção SO até encontrar o Rio de Iguape (NAVARRA, 1988). O Rio Una do Prelado possui sistemas de drenagem bastante difusos, distribuídos pelos terrenos podzólicos da planície aluvional (LOPES & POR, 1990).

Existem os rios exógenos (rios de águas brancas), que nascem fora da baixada, seja no planalto, seja nos limites da região serrana. O Rio da Ribeira, cuja nascente é no Paraná, é o único rio de nascente que banha a região. No estado de São Paulo ele desce a região serrana com ímpeto que vai perdendo aos poucos na região pré-serrana até chegar em Eldorado. Apartir daí ele torna-se navegável com um desnível até o mar de 0,16 m por km. Mudando de nome, para Ribeira do Iguape, na Baixada ele recebe o afluxo dos seus afluentes mais importantes, pela margem esquerda, o Rio Juquiá, e pela margem direita o Rio Jacupiranga (NAVARRA, 1988; LOPES & POR, 1990).

Os Rios de Escarpa, nascem na Região Serrana, descem inicialmente com grande declive, formando as vezes cachoeiras e tem pouco percurso na Baixada

onde passam a ser tributários de Rios de Baixada. Como o Rio Verde que nasce no Maciço da Juréia (NAVARRA, 1988; LOPES & POR, 1990).

Praticamente todos os rios da região encontram-se sob influência da água do mar. A alternância das fases marinhas e de água doce, em conjunto com as amplas flutuações do pH, representam um grande estresse ambiental para a biota dos rios da Baixada. Por isso, os rios de águas claras e de águas pretas da região não possuem condições favoráveis para o estabelecimento de uma fauna endêmica comparável à dos rios amazônicos (LOPES & POR, 1990).

A rede hidrográfica existente na Estação Ecológica de Juréia-Itatins, constituída pelos rios Una do Prelado, praticamente circunda o Maciço da Juréia, Grajaúna, Verde, Descalvado, Branco, Carvalho, Cacunduva, Guaraú, das Pedras, Despraiado e o rio Itinguçu (LANGEANI FILHO, 1989). O rio Una possui um curso Noroeste (NO) através de um plano sedimentar com elevação extremamente baixa (4 metros), delimitado pelas enrugações da montanha precambriana da Serra dos Itatins (POR et al, 1984).

O Rio Una do Prelado é um dos mais importantes rios da região, servindo como bacia de captação dos diversos rios que descem a vertente norte da Serra da Juréia e a vertente atlântica da Serra dos Itatins. Esse rio funciona como um coletor dessas águas, não tendo uma nascente propriamente dita. Sendo o rio Una um rio de elevação mínima, é dominado pela influência das marés, que é sentida por mais de 30 km ao longo do rio. É fortemente influenciado pelas águas das chuvas, pelo fato de estar numa região com alto índice pluviométrico. Este rio carrega alternadamente água salgada e água doce (CAPOBIANCO, 1987).

Durante o período de seca e na primavera o rio se torna um rio tipicamente com características de estuário invadido pela salinidade normal e as características tamponantes da água do mar (POR et al., 1984).

O Rio Una do Prelado é um rio de “água preta” (“Una” quer dizer negro em tupi guarani) com cloreto de sódio dominante e coloração escura devido à

presença de substâncias húmicas em teores excepcionalmente altos, possivelmente originada pelo processo de lixiviação do material vegetal originado na restinga, responsável pela liberação de ácidos húmicos (LOPES & POR, 1990). No período de chuvas o teor orgânico aumenta notavelmente e as águas adquirem um tom amarelo escuro intenso. Em função da presença de ácidos húmicos, o pH diminui, variando na faixa de 3,7 a 6,0. O balanço ânion-cátion não é satisfatório para os rios de águas pretas devido possivelmente à capacidade de retenção de cátions da matéria orgânica humificada. Há uma conservação de bicarbonato cálcio com aumentos relativos e absolutos de cloreto de sódio. Podendo-se pensar num processo de salinização uma vez que não é possível a influência da contaminação do aquífero com águas marinhas (NAVARRA, 1988).

O rio Una é comparado de antemão com o rio de água preta da Amazônia e também se aproxima com o sistema de estuário de Cananéia (POR et al., 1984).

Devido ao fato de variar muito as condições hidrológicas, a fauna mostra densidades muito baixas. A floresta de mangue é bem desenvolvida mas não é acompanhada da usual presença de ostras, cracas e mexilhões nesse ecossistemas (CAPOBIANCO, 1987).

Em função destas características o *phylo-* e o *zooplankton* do estuário representa uma imagem muito flutuante. O *zoobenthos* que rodeia a floresta tropical é extremamente esgotado, tanto em número de espécies como na densidade populacional. O *phylobenthos* de macroalgas é favoravelmente bem desenvolvido (POR et al., 1984).

2.2-Ecologia de Leveduras

Segundo JONES (1987) é bastante difícil se definir uma comunidade natural, uma vez que não se consegue isolar a maioria das bactérias e fungos presentes no substrato conhecidos como microrganismos não cultiváveis. O ecossistema é uma

unidade funcional elementar da ecologia, compreendendo os organismos, o meio ambiente e as relações entre eles. As bactérias e os fungos são partes essenciais de quase todos os ecossistemas (RHEINHEIMER, 1987).

O estudo de ecologia de leveduras se preocupa com a maneira pela qual elas se propagam na natureza. Também é estudado os substratos na natureza que possam suportar o crescimento das leveduras, e as razões específicas para a ocorrência nos ambientes naturais em questão. Paralelamente procura-se estudar a interação entre elas e outros tipos de microrganismos, assim como as demais formas superiores de vida (insetos, animais, algas, plantas, etc.). A maioria das leveduras possuem uma vida saprófita, mas podem ocorrer na forma de parasitas (PHAFF et al., 1978).

As leveduras podem ser definidas como fungos unicelulares reproduzindo-se por brotamento ou fissão (KURZMAN & PHAFF, 1969; DAVENPORT, 1980).

Leveduras estão associadas as plantas pelo fato delas oferecerem maior variedade de substratos essenciais para o crescimento das leveduras, como os açúcares, polissacarídeos, compostos de carbono, sais minerais do solo, micronutrientes e vitaminas (PHAFF & STARMER, 1987).

A superfície externa das folhas proporciona um excelente ambiente para o desenvolvimento de microrganismos. Normalmente, as folhas de clima tropical eliminam exsudatos açucarados, que podem suprir a necessidade de carbono das leveduras. A maioria das leveduras que crescem em folhas são degradadoras, fazendo parte de gêneros não fermentativos, como: *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Aureobasidium*, *Sporobolomyces*, *Kluyveromyces veronae*, *Saccharomyces rosei* e *Sacch. pretoriensis* (PHAFF et al., 1978).

Flores abrigam leveduras que se alimentam do néctar. A dispersão de leveduras entre as flores ocorre principalmente através das abelhas responsáveis pela polinização e outros insetos (vespas, borboletas) que se alimentam do néctar das flores. Leveduras estudadas em flores fazem parte de um grupo bem definido. A maioria das leveduras associadas a flores são estritamente oxidativas, sendo a

minoría fermentativa. *Aureobasidium* é sempre a mais encontrada, seguida por espécies de *Cryptococcus*, *Rhodotorula* e *Sporobolomyces*, *Candida* e *Torulopsis* (PHAFF et al., 1978).

Na região de Uruarama, no Estado do Rio de Janeiro, foram isoladas leveduras coletadas do solo, fruta, flor de abacaxi (de variedade *Dysmicoccus brevipes* e *Thecla basilidis*), sendo encontradas linhagens representantes dos gêneros *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Trichosporon*, *Candida*, *Geotrichum*, *Hanseniaspora*, *Hansenula*, *Pichia* e linhagens de leveduras pretas (HAGLER & AHERAN, 1987).

Foi realizado um trabalho sobre isolados de leveduras em frutos de espécies nativas da Região do Banhado Grande, na Estação Ecológica de Juréia-Itatins. Foram coletados frutos carnosos de vinte espécies diferentes de angiosperma durante o período de 1991 e 1992, onde duzentas e duas linhagens de leveduras e fungos leveduriformes foram isoladas. Dessas 73,8% apresentaram afinidade ascomicética, sendo que *Candida* e *Kloeckera*, juntamente com o seu estado perfeito, *Hanseniaspora*, foram os predominantes. *Cryptococcus*, *Sporobolomyces*, *Bullera*, *Pichia*, *Hansenula*, leveduras pretas e outras linhagens com afinidade basidiomicéticas também foram isoladas (PRADA, 1994).

Os gêneros encontrados em árvores foram: *Saccharomyces kluyveri*, *Schizosaccharomyces*, *Rhodosporidium*, *Citeromyces*, *Candida*, *Pichia*, *Torulopsis*, *Cryptococcus* entre outros. Estas leveduras estão comumente associadas a exsudatos que são liberados em lesões do caule ou a insetos que se alimentam destes exsudatos (PHAFF et al., 1978).

A maioria dos estudos sobre associação de leveduras com animais estão relacionados a animais de sangue-quente, insetos e crustáceos. Existem leveduras capazes de crescer nos intestinos de animais, sendo algumas delas patogênicas. Exemplos de leveduras consideradas parasitas facultativos, com a capacidade de crescer a 37°C e se multiplicar na cavidade intestinal de animais são: *Candida tropicalis*, *C. parapsilosis* e *Trichosporon cutaneum*. Dentre as leveduras que

podem estar associadas a infecções estão: *Candida albicans*, *C. stellatoidea*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *Torulopsis glabrata*, e *Cryptococcus neoformans*. Leveduras não patogênicas podem também ocorrer na pele (carcaça) do animal (PHAFF et al., 1978).

Exame de vários gêneros de peixes da baía de Biscayne e do litoral das Bahamas, revelaram que as leveduras estão restritas ao trato intestinal da maioria destes animais (FELL & VAN UDEN, 1963).

Linhagens de *Candida parapsilosis*, entre outras, foram encontradas em peixes e mariscos fermentados na Tailândia. Esta espécie foi também isolada de frutos, flores, vegetais fermentados, cereais fermentados e alimentos não fermentados (SUZUKI et al., 1987).

Foram isoladas 35 culturas de leveduras de camarão (*Penaeus setiferus*) coletado no Golfo na Costa do Texas. As culturas foram agrupadas nos gêneros *Rhodotorula*, *Trichosporon*, *Torulopsis*, *Pullularia*, *Candida*, *Hansenula* e *Trichosporon* (PHAFF et al., 1952). Dentro das leveduras isoladas prevaleceram as fermentativas, do gênero *Candida*, *Geotrichum*, *Trichosporon*, *Debaryomyces*, *Rhodotorula*, *Kloeckera*, *Cryptococcus* e *Hansenula* num trabalho relacionado com camarão (*Penaeus schmitti*) na baía de Rio de Janeiro (PAGNOCCA et al., 1987).

Leveduras como *Rhodotorula* e *Torulopsis* foram encontradas nos sedimentos e no intestino do caranguejo *Uca pugilator*, na zona de mares na costa oriental americana, com indícios que levam a crer que as leveduras favorecem o crescimento deste crustáceo (RHEINHEIMER, 1987).

Provavelmente os insetos constituem a maneira mais importante das leveduras se disseminar na natureza. A associação frequente de leveduras com os insetos é reconhecida como o resultado da importância nutricional dos microrganismos no ciclo de vida de várias espécies de animais (PHAFF & STARMER, 1987). Como é o caso da *Drosophila* (ROSA, 1993). Esta associação

também pode ser simplesmente mecânica, onde os insetos carregam as leveduras nas partes externas do corpo (PHAFF & STARMER, 1978).

O solo pode ser considerado, na maioria dos casos, um reservatório onde as leveduras podem crescer livremente. Uma vez que o solo abriga plantas, micro e macro organismos, resíduos de animais, etc, é possível se isolar uma grande variedade de leveduras desse ambiente. Algumas das espécies comumente encontradas no solo são: *Hansenula saturnus*, *H. californica*, *H. suaveolens*, *Debaryomyces castellii*, *Candida humicola*, *C. scottii*, *Cryptococcus terreus*, entre outras (PHAFF et al., 1978; PHAFF & STARMER, 1978). Leveduras do gênero *Torulopsis* e *Candida* foram encontradas e identificadas em estudo de leveduras do solo da Amazônia (MOK et al., 1984).

2.2.1-Leveduras associadas a ambientes aquáticos.

Fungos filamentosos e leveduras podem ser encontrados em lagos, rios e mangues, vivendo nos ambientes mais diversos, como os fungos que se desenvolvem igualmente no solo úmido, nos lagos e nos rios (YAMASATO et al, 1974). Fungos aquáticos necessitam de nitrogênio livre, proteínas, açúcares, lignina e quitina, podendo se desenvolverem em águas ácidas ou alcalinas (crescendo na faixa de pH de 3,2 a 9,6) (GOTO et al, 1974a).

A maioria dos estudos feitos com leveduras, tem relacionado leveduras de estuários, zonas costeiras e litorâneas, e na maioria dos casos relaciona-se com águas poluídas. O estudo com águas de Oceanos e de água doce ainda é bastante escasso (YAMASATO et al. , 1974).

Um número bastante variado de leveduras pode ser encontrado em águas doces ou salgadas. A população de leveduras é muito maior em água doce que na salina, sendo que a população de leveduras decresce a medida que se vai distanciando da costa em direção ao mar aberto (HAGLER & AHERAN, 1987)

É evidente que as águas recebem as leveduras provenientes de diferentes fontes. O carreamento de leveduras por fontes terrestres pode ser mais provável em rios, lagoas e regiões costeiras. Por outro lado as leveduras podem se propagar na fauna e flora características do ambiente aquático, como por exemplo algas e os plânctons em oceano aberto (HAGLER & AHERAN, 1987).

Dentre as leveduras encontradas em água salgadas estão: *Candida diddensii*, *Candida polymorpha*, *Rhodotorula rubra*, *Rhodotorula marina*, *Cryptococcus laurentii*. As leveduras produtoras de esporos encontradas foram: *Debaryomyces hansenii*, *Rhodosporidium sphaerocarpum*, *Rhodosporidium dactyloides* e algumas do gênero *Metschnikowia* (PHAFF et al., 1978).

Leveduras de modo geral são mais abundantes no litoral do que em águas oceânicas, existindo uma forte evidência de que elas são mais abundantes em estuários do que em oceanos. A presença de leveduras aquáticas é justificada pelo reabastecimento oriundo do escoamento terrestre das matérias vivas no mar e presença de resíduos biológicos (VAN UDEN & FELL, 1968)

Leveduras marinhas são aquelas isoladas de materiais marinhos com equivalentes terrestres conhecidos. Com isso diversas espécies novas vem sendo descritas como oriundas de fontes marinhas. Quando se fala de ambiente marinho, considera-se tanto do mar aberto quanto as regiões de estuário e águas confinadas que são influenciadas pelas marés, onde a salinidade não é significativamente diferente da água do mar para onde elas fluem. Com poucas exceções, leveduras oriundas da água do mar tem correspondentes terrestres. Uma delas é a *Metschnikowella*, oriunda de ambiente marinho, mas que já conta com indicações de que seus representantes podem ser encontrados em todos os lugares (VAN UDEN & FELL, 1968).

A presença de leveduras verdadeiras em água do mar foi detectado por Fischer e Brebeck em 1894. Em 1908, Tsinklinsky isolou duas espécies de leveduras em água marinha na costa do sul do mar da China. Gräf, em 1909, isolou a espécie *Torula denitrificans*. Em 1955, Bhat e Kachwalla coletaram leveduras aquáticas

entre 2 a 6 milhas da costa de Bombay, encontrando: *Saccharomyces italicus*, *S. chevalieri*, *S. rosei*, *Debaryomyces hansenii*, *Pichia guilliermondii*, *Candida tropicalis*, *Torulopsis glabrata*, *T. candida* e algumas espécies do gênero *Rhodotorula*. Outros estudos foram realizados por Kriss e co-autores, em 1959, que constatarem a presença da *Rhodotorula rubra*, *Rhodotorula glutins* e *Cryptococcus aerius* em ambientes marinhos. Fell, em 1960, isolou 179 culturas procedentes de 55 amostras na baía da Biscayne, na Flórida, onde culturas do gênero *Candida* e *Rhodotorula* foram predominantes. Shimano, em 1962, isolou 115 diferentes espécies de leveduras do Pacífico Norte, próximo ao Japão (VAN UDEN & FELL, 1968).

Estudos envolvendo isolados de leveduras em estuários são mais recentes, iniciando-se por VAN UDEN em 1967, no litoral da Flórida e da Califórnia. No estuário do rio Tagus, Sado, e Guadiana em Portugal a contagem populacional foi de 118 a 1228 unidades de leveduras viáveis por litro (VAN UDEN & FELL, 1968).

Num trabalho de isolamento de leveduras de águas marinhas, procedentes das praias de Piedade, Boa Viagem (Recife) e do canal de Santa Cruz, na Ilha de Itamaracá (PE), foram considerados como fatores importantes: profundidade de coleta, temperatura, salinidade, pH, oxigênio e a presença ou ausência de algas. Fatores como salinidade, temperatura, profundidade e concentração de matéria orgânica foram decisivas para diferenciar o material coletado. Uma variedade maior de espécies de leveduras (*Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii*, *Candida parapsilosis*, *Rhodotorula graminis*, *Saccharomyces bailii* e *Debaryomyces vini*) foi isolada da Praia de Piedade. Na Praia de Boa Viagem foram isoladas 77 colônias de leveduras imperfeitas pertencentes a 2 gêneros distintos: *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* e *Rhodotorula graminis*. No Canal de Santa Cruz foram isoladas 78 colônias de leveduras, todas imperfeitas, representada pelo gênero *Candida* (QUEIROZ & MACEDO, 1972).

A análise quantitativa e qualitativa de leveduras isoladas de algas marinhas procedentes das Praias de Piedade e Boa Viagem, foram realizadas em 25 amostras de algas, classificadas em 7 gêneros distintos. Na Praia de Piedade foram coletadas amostras de algas pertencentes a 5 gêneros. Tendo sido isolados 42 colônias de leveduras pertencentes ao gênero *Candida*. Na Praia de Boa Viagem foram colhidas amostras de algas pertencentes a 3 gêneros, tendo sido isoladas 60 colônias de leveduras representada por *Candida tropicalis*, *Trichosporon sp.*, *Torulopsis versatilis* e *Saccharomyces florentinus* (QUEIROZ, 1972).

Leveduras isoladas em ambientes marinhos como *Rhodotorula rubra*, *Aureobasidium pullulans*, *Candida sp.*, *Cryptococcus albidus* variedade *albidus*, *Debaryomyces hansenii* foram cultivadas em meios com salinidade variada, para testar o crescimento sob condições específicas de osmotolerância. *Debaryomyces hansenii* apresentou uma maior tolerância às condições salinas diversas, ficando *Aureobasidium pulullans* com a menor taxa de crescimento (HERNANDEZ - SAAVEDRA et al., 1995; HERNANDEZ - SAAVEDRA et al., 1994; GOVIND & BANASZAK, 1992).

Leveduras foram encontradas no Oceano Pacífico desde a superfície até 4000 metros de profundidade. A maioria das linhagens foram identificadas como *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces* e *Candida*. A tolerância salina para estes gêneros variam de 9 a 21%. Nesta pesquisa 73,3% das leveduras foram isoladas da superfície. Das restantes, a maioria foi isolada entre 0 a 20 metros de profundidade e somente algumas poucas espécies foram encontradas entre 20 a 400 metros de profundidade (YAMASATO et al., 1974). Os mesmos gêneros foram também encontrados na superfície da água do mar na Península de Miura, Japão, entre 0,3 e 3,0 metros de profundidade (GOTO et al., 1974b).

Entre linhagens de leveduras coletadas de sedimentos a 1200 metros de profundidade, na Baía de Sagami e na Baía de Suruga no Japão em 1977 identificou-se uma linhagem de *Candida* (linhagem Y 40) caracterizada pela habilidade em degradar n-alcanos (FUKUMAKI et al., 1994).

No estuário da Baía de Biscayne, as leveduras foram encontradas em profundidade de 9 cm do sedimento. A presença das leveduras em profundidade ligeiramente maiores, dentro dos sedimentos é devido à considerável agitação das ondas e do rápido assentamento do sedimento, que é característico de áreas de estuário com águas rasas (VAN UDEN & FELL, 1968).

O gênero *Candida* e seus teleomorfos são também bastante frequentes em água doce. As espécies *Candida diddensi*, *Candida intermedia* foram associadas à água do mar e à água doce poluída. Espécies do gênero *Cryptococcus*, especialmente *Cryptococcus albidus* e *Cryptococcus laurentii* são tipicamente associadas a água doce não poluída e água litorâneas (VAN UDEN & FELL, 1968; HAGLER, 1978).

Espécies como *Candida famata*, *Candida guilliermondii*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Cryptococcus laurentii* e *Rhodotorula glutinis* foram associadas a algas de água doce no Japão (HAGLER & AHERAN, 1987).

Em trabalhos realizados nas redes de tratamento de águas da Região da grande São Paulo, foram isolados vários gêneros entre quais: *Cryptococcus*, *Kloeckera*, *Rhodotorula* e *Torulopsis* (APOLINÁRIO & MILANEZ, 1986a), *Trichosporon*, *Aureobasidium* (APOLINÁRIO & MILANEZ, 1986b), *Hansenula*, *Debaryomyces*, *Pichia* (APOLINÁRIO & MILANEZ, 1985a) e *Candida* (APOLINÁRIO & MILANEZ, 1985b).

Uma possível fonte das espécies de leveduras pode ser a margem de rio, pois *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces* e *Saccharomyces* foram isolados de vegetações da mata ciliar. Estas leveduras podem estar associadas com a parte externa das folhas, que criam um meio apropriado para o seu crescimento (PHAFF et al., 1966).

Espécies autóctones fazem parte da biota normal de ambientes aquáticos, como o *Debaryomyces hansenii*, *Candida parapsilosis* e algumas leveduras basidiomicéticas e seus anamorfos. Uma grande diversidade das alóctones também

estão presentes em ambientes aquáticos (HAGLER & MENDONÇA-HAGLER, 1991b).

As leveduras vermelhas, sempre freqüentes em estudos de leveduras aquáticas, especialmente em água doce, chegam a quase 50% desta população, tendo como representantes frequentes gêneros como *Rhodotorula*, *Rhodosporidium* e *Sporobolomyces*. O gênero *Sporobolomyces* é oxidativo, representado por leveduras vermelhas basidiomicéticas, produtoras de balistosporos, associadas com o nicho de plantas terrestre e carregadas para a água pelas folhagens. O gênero *Rhodosporidium* está associado à vegetação marinha (HAGLER, 1978; HAGLER & AHERAN, 1987; NEWELL & FELL, 1970).

Leveduras associadas à água doce foram isoladas no Lago Douglas e identificadas como *Rhodotorula*, *Cryptococcus* e *Candida* (COMI et al., 1983). Estudos sobre espelhos d'água da região do Lago Michigan demonstraram a presença do gênero *Candida* e *Rhodotorula* tanto nas águas poluídas ou limpas (WOOLLET & HEDRICKI, 1970). Analisando-se as águas do rio Mosella, da nascente à foz, nas águas limpas prevaleceram espécies do gênero *Rhodotorula* e nas águas poluídas prevaleceram *Candida* e *Trichosporon* (HINZELIN et al. apud COMI et al., 1983).

O gênero *Cryptococcus* ocorre com maior incidência em locais de água limpa (HAGLER & AHERAN, 1987), entretanto existe registros de seu isolamento em esgotos e águas fortemente poluídas (PEÇANHA, 1993; HAGLER, 1978; APOLINÁRIO, 1984).

Os gêneros *Aureobasidium*, *Hansenula* e *Rhodotorula*, apresentam uma distribuição ampla, sendo encontrados tanto em locais poluídos como em locais não poluídos (APOLINÁRIO, 1984). *Aureobasidium pullulans* é a espécie mais difundida, em meios de isolamento apresenta pigmentação variando de creme a vermelho, róseo ao verde, com bordas inteiras no início do crescimento, passando gradualmente à uma pigmentação marrom escura a preta, com bordas rizóides ou irregulares. Por estar associada à folhagem e ao solo, provavelmente possui um ciclo

similar à *Sporobolomyces*. Existem espécies relacionadas à águas poluídas, como *Trichosporon beigeli* (PEÇANHA, 1993), *Candida krusei*, *Candida tropicalis* e *Candida glabrata* (AHERAN et al., 1968; HAGLER & AHERAN, 1978; PEÇANHA, 1993).

A microbiota do lago Champlain, USA, mostrou que em áreas diretamente afetadas por efluentes industriais e domésticos, a população de leveduras geralmente excede 300 unidades formadoras de colônia (UFC) por 100 mL enquanto os locais com níveis de poluição muito baixo ou não poluído apresentaram contagem de 20 UFC/100 mL. Foram isoladas representantes dos gêneros *Rhodotorula*, *Torulopsis*, *Cryptococcus albidus*, *Aureobasidium pullulans*, leveduras pretas e leveduras do complexo *Candida krusei* / *Pichia membranofaciens*. Uma concentração maior de leveduras foi encontrada próxima à superfície. Leveduras como *Cryptococcus albidus*, *Rhodotorula rubra*, *Rh. glutins*, *Aureobasidium pullulans* são todas oxidativas (MEYERS et al., 1970). Nestas áreas do lago, havia predominância de grupos fisiológicos distintos, o que levou o autor a sugerir a possibilidade de usar várias espécies de leveduras como indicadores específicos da qualidade da água. Em águas não poluídas a predominância tem sido de espécies dos gêneros *Cryptococcus* e *Rhodotorula* (VAN UDEN & AHERAN, 1963; MEYERS et al., 1970; SANTOS, 1980). *Candida* e *Rhodotorula* foram os gêneros isolados em esgotos domésticos. Leveduras do gênero *Candida* foram apontadas como possíveis indicadores de água poluída, já que tem sido isolada frequentemente em fezes de animais de sangue quente e consideradas patógenas ou potencialmente patógenas (CARMO DE SOUZA, 1969; SANTOS, 1980).

Foram coletadas amostras de águas litorâneas poluídas da Ilha de São Vicente e de águas não poluídas de Bertioga (SP), entre o período de março a dezembro de 1976, tendo sido isoladas 500 colônias de leveduras, distribuídas nos gêneros: *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Torulopsis*, *Trichosporon*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Pichia* e *Sporobolomyces*. Os resultados revelam a possibilidade de leveduras do gênero *Candida* serem um novo marco indicador de poluição em águas de estuários marinhos. Leveduras de águas do mar e estuarinas

participam de processos ecológicos bastante notórios, tendo como papel central de conversão de substratos orgânicos, mineralizados, reciclagem de nutrientes, biodegradação do óleo ou como decompositores dos animais marinhos (PAULA et al, 1983).

Coletas realizadas no Egito resultaram em 269 linhagens isoladas de diferentes amostras de água coletadas. Estão incluídas 126 linhagens isoladas em água fresca, 108 isoladas em despejo de esgotos e 35 de águas residuais de uma fábrica de açúcar de cana. Foram identificadas 16 espécies pertencentes a 11 gêneros. *Debaryomyces hansenii*, *Rhodotorula mucilaginosa* e *Torulaspora delbrueckii* foram predominantes em água fresca, a *Debaryomyces hansenii*, *Trichosporon beigeli*, *Rhodotorula mucilaginosa* e *Kluyveromyces marxianus* foram espécies predominantes em esgotos e *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus* e *Trichosporon beigeli* foram espécies predominantes em águas residuais da fábrica de açúcar de cana (HARDY, 1993).

Leveduras e bactérias foram isoladas da água acumulada na parte central de duas bromélias, *Neoregelia cruenta* de uma duna próxima ao litoral e *Quesnelia quesneliana*, originária do mangue, ambas próxima a cidade do Rio de Janeiro (Brasil). A comunidade de leveduras *N. cruenta* foi típica de superfície de plantas com anamorfos basidiomicéticos. A levedura preta *Aureobasidium pullulans* foi a população prevalecente. A *Quesnelia quesneliana* possui uma proporção substancial de leveduras ascomicéticas e seus anamorfos, incluindo provavelmente o novo biotipo de *Saccharomyces unisporus*. A comunidade microbiana em águas acumuladas em bromélias é tipicamente autoctone e não contaminante (HAGLER et al., 1993).

Foram feitos estudos no Oceano Índico, mostrando a relação entre leveduras terrestres e aquáticas, onde a população das leveduras serve como fonte de alimento para a população do zooplankton do mesmo ambiente (oceano). Um grande número de leveduras terrestres foram encontradas no meio ambiente estuarino apresentando características de espécies pertencentes a dois grupos: grupo

1: *Candida e Cryptococcus*, grupo 2: *Rhodotorula, Torulopsis, Debaryomyces e Trichosporon*, leveduras estuarinas fermentativas, que crescem na faixa de 6 a 44°C, possuindo uma utilização limitada de componentes orgânicos (RHEINHEIMER, 1987).

2.3-Leveduras: importância, definição e aspectos históricos de sua taxonomia.

O ponto de partida para o desenvolvimento biotecnológico está em procurar e descobrir fenômenos biologicamente exploráveis. Tal processo inicia-se com a procura de materiais biologicamente apropriados, seleção das propriedades desejáveis e é finalizado com a opção pelo subgrupo de organismo selecionado para a obtenção do processo ou produto final desejado (BULL et al., 1992).

A área de classificação de organismos é uma das áreas de maior desafio na biologia (BULL et al., 1992). Sistemática é o estudo científico da taxa e diversidade de organismos juntamente com todas as relações que os envolve. É uma disciplina fundamental que engloba classificação, nomenclatura, identificação, análise filogenética, processos evolutivos e mecanismos genéticos (GOODFELOW & O'DONNELL, 1992).

O termo levedura sempre foi associado na história ao processo fermentativo. O significado da palavra levedura provém do latim “levere” e significa suspender, referindo-se a produção de gás carbônico durante a fermentação, levantando a superfície líquida como uma espuma (PHAFF et al., 1978). O primeiro uso das leveduras foi provavelmente na mistura de populações de leveduras com suco de frutas ou grãos de cereais, resultando em bebidas alcóolicas conhecidas, como vinho e cerveja.

2.3.1-Taxonomia convencional.

Há mais de 4000 anos as leveduras já estavam presentes nas tumbas Egípcias, em Thebes no Rio Nilo, na forma de bebida e pão fermentado. As primeiras pesquisas científicas foram feitas por Van Leeuwenhoek em 1680, quando foi possível observar em microscópio “corpos” muito pequenos. Vários pesquisadores continuaram a estudar o assunto. Em 1876 Pasteur publicou um livro sobre processos fermentativos em condições anaeróbicas, mostrando a habilidade respiratória e fermentativa das leveduras. Emil Christian Hansen estudou características morfológicas e fisiológicas das leveduras, tendo diferenciado e caracterizado inúmeras espécies. Em 1896, Hansen elaborou o primeiro sistema de classificação taxonômica de leveduras, de acordo com a revisão de PHAFF et al. (1978).

Somente em 1931 foi elaborado por Stelling-Dekker um sistema de classificação mais completo. Estudos taxonômicos envolvendo leveduras não esporulantes foram elaborados por Lodder em 1934 e Diddens em 1941 (PHAFF et al., 1978). Um novo sistema de classificação foi elaborado em 1952 por Lodder e Kreger Van-Rij, envolvendo tanto leveduras esporulantes como não esporulantes. Esta publicação é conhecida por ter abordado a taxonomia de leveduras de forma bastante extensa. LODDER (1970) e BARNETT et al., (1977) revisaram os sistemas de classificação de leveduras dando ênfase às características fisiológicas.

Fazendo parte do Reino Fungi, as leveduras são classificadas como Eumycota (Eumycetes). Dentro desta divisão existem três classes diferentes: Ascomycetes, Basidiomycetes e Deuteromycetes. As duas primeiras classes são caracterizadas por serem produtoras de esporos e por terem um ciclo sexual característico. As leveduras deuteromicéticas, também conhecidas como leveduras imperfeitas, apresentam características morfológicas semelhantes às leveduras ascomicéticas ou basidiomicéticas, entretanto não foram observadas ainda a produção de esporos e a presença de um ciclo sexual definido. (LODDER, 1970; PHAFF et al., 1978; KREGER-VAN RIJ, 1984; KURTZMAN, 1988; BARNETT et al., 1990).

Originalmente, a caracterização das espécies de leveduras estava concentrada principalmente na morfologia dos estados vegetativos e sexuais, sendo posteriormente incluídos testes fisiológicos e genéticos. (KREGER-VAN RIJ, 1984a; BARNETT et al., 1990; HAGLER & MENDONÇA-HAGLER, 1991b).

Dentro das propriedades bioquímicas estudadas para a identificação está a habilidade em fermentar e assimilar diferentes açúcares. Substâncias ricas em fonte de carbono, como as frutas, favorecem o crescimento da maioria das leveduras que possuem habilidade de metabolizar açúcares e outros componentes orgânicos através da fermentação. Leveduras com dificuldade em sintetizar as hexoses, conseguem em contrapartida, assimilar uma variedade de componentes orgânicos não fermentescíveis encontrados em ambientes específicos que servirão de base para seu estudo taxonômico (KREGER VAN RIJ, 1984). A habilidade em assimilar e fermentar diferentes componentes só terá valor taxonômico se fornecer uma resposta constante (BARNETT et al., 1990).

Para definir a característica ascomicética ou basidiomicética de uma levedura utiliza-se testes de DBB (Diazonium Blue B) e hidrólise de uréia (HAGLER & AHERAN, 1981). A reação positiva para estes testes ocorre apenas com leveduras basidiomicéticas e seus anamorfos. Outro teste com a mesma finalidade é a habilidade das leveduras em crescer em ácido tartárico como única fonte de carbono, sendo o teste positivo para leveduras basidiomicéticas. (FONSECA, 1992).

Apesar da taxonomia convencional ser bastante eficiente e de grande importância, os testes consomem muito tempo de trabalho (PINCUS et al, 1988; BELIN, 1981). Para se diminuir o número de erros e agilizar a identificação, foram desenvolvidos como métodos alternativos, os “kits” para análise (Api System, Any Analbtap Products Inc., Nuncion Delta S1). Estes sistemas ainda possuem pouca abrangência e são válidos somente para pequenos grupos de leveduras (HEARD & FLET, 1990; BELIN, 1981; GUNASSEKARAN & HUGHER, 1980; AUGUSTYN et al., 1991).

Os trabalhos realizados em taxonomia de leveduras trouxe um grande avanço nos testes da taxonomia convencional com a introdução de técnicas moleculares (KREGER-VAN RIJ, 1984 e BARNETT et al., 1990).

2.3.2-Técnicas de taxonomia molecular e quimiotaxonomia

Recentemente os estudos quimiotaxonômicos vêm incrementando a taxonomia (OLSEN, 1990) pois provêm de critérios exatos, reprodutíveis (OLSEN & BRANDZ, 1992). Dentre os métodos utilizados na quimiotaxonomia de leveduras podemos encontrar: composição de bases do DNA, mapeamento do DNA, homologia de DNA-DNA, análise de enzimas, espectro citocromático, perfil de proteínas e polipeptídeos, fator “killer” de leveduras, perfil de ácidos graxos e outros. (OLSEN, 1990).

Pesquisas na composição química e bases de ácidos desoxiribonucleicos das leveduras são importantes para a descrição do organismo. Estas características não são analisadas rotineiramente, mas são essenciais na descrição de novas espécies (OLSEN, 1990).

Avanços nos equipamentos e técnicas analíticas como cromatografia, eletroforese e outras técnicas físico-químicas permitiu uma melhoria nas análises quimiotaxonômicas, em relação as décadas passadas. Os seus estudos se concentram na elucidação da composição química das células microbianas e de seus produtos metabólicos (OLSEN & BRANDZ, 1992; KOMAGATA & SUZUKI, 1973).

Uma alternativa rápida e eficiente aos testes convencionais é a caracterização de microrganismos através da composição dos seus ácidos graxos, por cromatografia gás-líquido. Este estudo foi realizado com 20 linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, demonstrando que grupos de linhagens individuais diferem no perfil de ácidos graxos (BENDO VÁ et al., 1991). Novas linhagens de *Candida* foram descobertas através de métodos quimiotaxonômicos (LEE et al.,

1993). Análise espectrofotométrica das células foi realizada com 12 espécies pertencentes aos gêneros *Candida*, *Saccharomyces* e *Kluyveromyces* (MONTRACHER & CLAISSE, 1987).

Através da taxonomia molecular foi possível comparar as relações filogenéticas entre linhagens de leveduras. Neste trabalho observou-se uma certa similaridade entre *Kluyveromyces lactis* com *Schwanniomyces occidentalis* e *Saccharomyces cerevisiae* (FREIRE et al., 1995).

A posição evolutiva da espécie *Candida maltosa* foi estudada através do sequenciamento de nucleotídeos de uma pequena subunidade ribossomal do gene RNA. As análises filogenéticas mostraram uma relação evolucionária de *Candida maltosa* com *Candida tropicalis*, *Candida viswanathii*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e *Candida guilliermondii* (OHKUMA et al., 1993). Um trabalho similar foi feito através da análise sequencial nucleotídica do DNA (LOTT et al., 1993).

Análise cladística foi utilizada para estudar a filogeneticamente 16 gêneros de leveduras e resultou em 7 gêneros controvertidos, entre eles o *Cryptococcus*. Estudos mostraram que 7 gêneros se desenvolveram em paralelo com os ascomicetos, logo, estes três gêneros possuem o mesmo sistema de desenvolvimento, as taxa estudadas foram: *Nematospora*, *Ashbya*, *Candida*, *Schizosaccharomyces*, *Schwanniomyces*, *Pichia*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Cryptococcus*, *Torulopsis*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Bullera*, *Sporidiobolus* e *Langenidium* (SUN & WU, 1992).

Estudos filogenéticos demonstram a relação entre o gênero *Pichia* e *Williopsis* (LIU & KURTZMAN, 1991). Através da base sequencial 18s e 26s do RNA mitocondrial das espécies dos gêneros *Halleya*, *Nematospora* e *Metschnikowia* (*Spermophthoraceae*) foi demonstrado que o gênero *Halleya* está filogeneticamente separado do gênero *Nematospora* e *Metschnikowia* (YAMADA & NAGAHAMA, 1991).

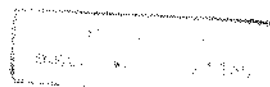
A ligação entre os dois estados anamorfo-teleomorfo, resulta em novas taxa de ascomicetos e basidiomicetos, demonstrando a natureza das leveduras e fungos imperfeitos. Considerando-se a formação de conídios, a ultraestrutura da parede celular e septos, a reação de Diazonium blue B, a fisiologia, a composição de carboidratos, o gênero *Candida* compreende tanto espécies ascomicéticas, quanto as basidiomicéticas. Algumas espécies basidiomicéticas foram excluídas do gênero *Candida* e transferidas em sua maioria das vezes para os gêneros *Cryptococcus* e *Rhodotorula* (WEIJMAN et al., 1988).

2.3.3-Análise de quinonas: significância e importância na taxonomia.

Ubiquinonas respiratórias ou coenzima-Q, genericamente denominadas Quinonas, foram estudadas a nível de microbiologia sistemática porque representam um dos critérios mais importantes na taxonomia moderna de leveduras. A análise do sistema de ubiquinonas é muito importante pois traz características importantíssimas a nível genérico e filogenético (BILLON-GRAND, 1989).

O primeiro estudo de quinonas em leveduras, foi feito por YAMADA & KONDÔ (1973), com 142 linhagens dos gêneros *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Sporobolomyces*, e *Rhodosporidium*. A Co-Q foi extraída e parcialmente purificada por cromatografia de camada delgada e por cromatografia em papel.

Coenzima-Q são componentes lipídicos internos da membrana mitocondrial das bactérias e das leveduras. Possuem um importante valor na cadeia transportadora de elétrons, na fosforilação oxidativa, no transporte ativo e produção de energia. Recentes estudos mostraram que a ubiquinona está presente nas membranas da célula mitocondrial e não mitocondrial, mas a função das ubiquinonas não mitocondriais ainda não foi totalmente elucidada (CLARKE et al., 1991). A variação na estrutura das quinonas isoprenóides é bastante significativo para a microbiologia sistemática. O início dos estudos de quinonas foi realizado com o grupo das bactérias, para a elucidação de sua função na parede celular, somente



muito tempo depois foi constatado o seu valor na análise taxonômica (COLLINS & JONES, 1981). A ubiquinona é uma molécula mais longa que os fosfolípidios da membrana mitocondrial interna e é encontrada tanto na forma livre como na forma ligada a proteínas (COLLINS & JONES, 1980).

Nas leveduras, as coenzima-Q consistem de quinonas isoprenoides divididas em dois grupos importantes, as naftoquinonas e as benzoquinonas. As naftoquinonas podem ser divididas em dois grupos as filoquinonas e as menaquinonas com base em sua estrutura. As benzoquinonas, também são divididas em dois grandes grupos: as plastoquinonas e as ubiquinonas (COLLINS, 1994).

A coenzima-Q é sensível a condições alcalinas ou muito ácidas e à presença de oxigênio e luz intensa pois são rapidamente fotooxidadas. A sua extração e a subsequente purificação é feita o mais rápido possível ao abrigo de luz, evitando-se pH extremos. A solubilidade é maior em solventes lipídicos comuns como acetona, dietileter, clorofórmio, etanol e éter de petróleo (COLLINS & JONES, 1980).

Uma pesquisa para a determinação da Co-Q por cromatografia líquida de alta eficiência foi realizada, constatando-se que a concentração ideal de glicose no meio de cultura é de 15 g/L. A lavagem da cultura deve ser feita no início da fase estacionária do crescimento microbiano e a extração não deve ultrapassar 60 minutos, sendo considerado que valores de concentração abaixo de 1% não possuem valor significativo na taxonomia (BILLON-GRAND, 1989).

Análise de coenzima-Q realizada em 11 linhagens representando os gêneros *Schwanniomyces*, *Lodderomyces*, *Lipomyces*, *Nematospora* e *Metschnikowia*, identificou o seu sistema como Co-Q-9, exceto o gênero *Nematospora* (espécie *coryli*) que foi identificado o sistema de coenzima Q-6, permitindo fazer uma separação filogenética entre os gêneros citados (YAMADA et al., 1977).

O gênero *Hansenula* consiste em espécies que apresentam diferenças consideráveis na assimilação, habilidade fermentativa, requerimento de vitaminas e diferença no percentual em mol de citosina e guanina (de 30% a 50%) do DNA,

apresentando dificuldades para sua identificação. Primeiros estudos envolvendo taxonomia e filogenia com o sistema de ubiquinonas de leveduras foi realizado por YAMADA et al (1973) envolvendo espécies de gêneros *Hansenula* e *Pichia*. Foi constatado o sistema Q-7 para o gênero *Hansenula* e Q-9 para *Pichia* (realizado em cromatografia em papel). Trabalhos posteriores mostraram que os gêneros *Pichia* e *Hansenula* foram divididos ambos em três grupos de sistemas de ubiquinonas (Q-7, Q-8 e Q-9) (YAMADA et al., 1973). A análise de coenzima-Q permitiu separar filogeneticamente as espécies de *Hansenula* de modo a representar as direções evolucionais de seus ancestrais. A maioria das espécies tem o sistema Q-7 como predominante e Q-6 em menor porcentagem. *Hansenula capsulata* e *H. hostii* apresentaram Q-8 como o componente em maior porcentagem. Neste mesmo trabalho foi feita a análise filogenética das espécies de gêneros *Debaryomyces*, *Dekkera*, *Hanseniaspora*, *Kloeckera* e *Lipomyces*, com base em ubiquinonas, sendo demonstrado ser este um dos critérios mais importantes nesta separação (BILLON-GRAND, 1987; YAMADA et al., 1973).

Estudos realizados com o *Debaryomyces* (NAKASE & SUZUKI, 1985) levou à divisão em dois grupos, onde o primeiro agrupa espécies com Q-6, apresentando a característica fortemente fermentativa (*D. globosus*, *D. franciscae* e *D. nilsonii*), e o segundo agrupa as espécies com Q-9 e de fraca fermentação (*D. hansenii* (*D. cantarelli* e *D. tamaritii*)). Neste mesmo estudo as leveduras fermentativas *Saccharomyces* e *Kluyveromyces* apresentaram o sistema Q-6 em maior porcentagem. *Endomycopsis* foi representado por três diferentes tipos de coenzima-Q (Q-7, Q-8 e Q-9) e a *Sacharomycopsis synnadenra* apresentou o sistema Q-8. Estes resultados colaboram com a observação de YAMADA et al. (1976) sobre a importância de Ubiquinonas no agrupamento taxonômico em leveduras.

O estudo de 43 espécies pertencentes a *Nadsonia*, *Saccharomycodes*, *Wickerhamia*, *Hanseniaspora* e *Kloeckera* demonstrou serem predominantemente Q-6, exceto para a única espécie analisada do gênero *Wickerhamia*, sistema Q-9. Estas constatações aliados a outros métodos quimiotaxonômicos (composição de

DNA, características sereológicas, espectro da parede celular) permitiram elaborar um agrupamento taxonômico mais seguro para estas leveduras (YAMADA et al., 1976).

Estudos realizados com 24 linhagens "tipo" produtoras de balistosporos, apresentou Q-10 para 4 espécies do gênero *Sporidiobolus* e 5 do gênero *Sporobolomyces*, exceto para uma espécie de *Sporobolomyces* que apresentou Q-10(H₂). Dentro do gênero *Bullera*, 11 gêneros apresentaram o sistema Q-10 e três espécies classificadas como *Bullera* sp. Q-9, podendo ser incluídas nos gêneros *Itersonia* ou *Tilletiopsis* (NAKASE & SUZUKI, 1986). Duas novas espécies de leveduras produtoras de balistosporos, a *Sporobolomyces griseoflavus* e *Sporobolomyces sosicola*, ambas isoladas de larva morta (*Sasa* sp.) oriundas do Japão (montanha) produtoras de pigmento e com balistosporos simétricos bilaterais, possuem sistema Q-10 além da ausência de xilose na célula (SUZUKI & NAKASE, 1987).

O gênero *Candida* possui características anamorfos relacionadas com os *Endomycetales* que excluindo os basidiomicetos anamorfos, foram transferidos ao grupo dos gêneros *Rhodotorula* e *Cryptococcus* (WEIJMAN et al., 1988).

Leveduras pretas ascomicéticas consistem de coenzimas-Q, prevalecendo os sistemas Q-10 e Q-10 desidrogenase (Q-10/H₂) nos gêneros como: *Aureobasidium*, *Hortae*, *Sarcionomyces*, *Botrynomycetes*, *Homonema*, *Pringskemia*, *Phaeococcomycetes*, *Exophiala*, *Rhinocladiella*, *Fonsecaeeae*, *Ramichloridium*, *Cryptococcus* e *Capronia*. Exceção constatada para *Capronia parasitica* (isolado de fungo) que apresentou o sistema Q-9 de coenzima (YAMADA et al., 1989; SUGYAMA et al., 1987).

O gênero *Candida* tem sido estudado com maior complexidade através da correlação entre a composição de ácidos graxos, coenzima Q, porcentagem em mol de guanina e citosina (G+C), dados sorológicos, espectro de ressonância magnética do próton e cariótipos eletroforéticos. Através destas correlações foi sugerido um

método conveniente para diferenciar as espécies de *Candida*. Através da análise de quinonas foi verificado que este gênero possui quatro variedades de ubiquinonas, as Q-6, Q-7, Q-8 e Q-9 (VILJOEN & KOCK, 1989; WEIJMAN et al., 1988).

Duas linhagens novas de *Candida* foram analisadas num estudo envolvendo linhagens de leveduras degradadoras de celulose e leveduras imperfeitas, isoladas de materiais naturais no Japão. A *Candida cellulolytica* possui o sistema Q-7 de ubiquinonas e 41,6 % em mol de citosina e guanina do DNA, a outra espécie descrita foi a *Candida fukuyamanensis* que possui o sistema Q-9 e 47,8% em mol de citosina e guanina do DNA (NAKASE et al., 1994).

No caso das *Candidas* (grupo imperfeito) a composição do sistema de Coenzima-Q é um critério muito importante na classificação. Para as *Candidas* o processo de extração é similar aos demais, apenas variando na etapa de lavagem onde são realizadas com solução de 0,9% de NaCl (MONTRACHER ET AL., 1990).

Através da análise de ubiquinonas, perfil de ácido graxo e porcentagem em mol de DNA foi possível transferir a *Candida apis* variedade *galacta* (origem de caçulo de abelha, 1970) para um novo taxa: *Candida galacta* combinação nova, separando-se do grupo da *Candida apis* (isolada de abelha, 1954). Espécies como *Candida apis*, *Candida apiculata*, *Candida bombi* e *Candida bombicola* apresentaram o sistema Q-9 de ubiquinonas. A *Candida apis* variedade *galacta* apresentou Q-8 como o sistema de coenzima de maior porcentagem. Decisivo neste trabalho foi o sistema de ubiquinonas e a comparação em mol de citosina e guanina entre a *Candida apis* e a *Candida galacta* combinação nova (*Candida apis* variedade *galacta*) (LEE et al., 1993).

O gênero *Trichosporon* tradicionalmente identificados pela formação de micélio verdadeiro e artrósporos demonstrou ser muito diverso com base na análise de ubiquinonas. *T. beigelli* apresentou 12 linhagens Q-10, 29 linhagens Q-9 e uma linhagem Q-8. Sete espécies representadas por doze linhagens, apresentaram o sistema Q-9, foi sugerido que *T. beigelli* fosse dividido em 4 grupos distintos devido

a sua alta heterogeneidade. Antes da análise de quinonas, este mesmo grupo estava dividido em dois grupos (o primeiro grupo que assimila melibiose e rafinose e o segundo o que não assimila melibiose e rafinose) (HARA et al., 1989).

O sistema de ubiquinonas encontrado no gênero *Endomyces* foi o Q-9. As quatro espécies de *Schizosaccharomyces* analisadas apresentaram variações nos resultados de ubiquinonas. *Schiz. pombe* e *Schiz. malidevorans* apresentaram Q-10, as espécies *Schiz. japonicus* e *Schiz. japonicus* variedade *versatilis* apresentaram o sistema Q-9 (YAMADA et al., 1973).

Para 40 representantes das espécies pertencentes aos gêneros *Brettanomyces* e *Dekkera* foram submetidas aos estudos do sistema de ubiquinonas, o sistema Q-9 foi encontrado em todas as espécies de ambos os gêneros analisadas. Desta forma ficou excluído a possibilidade de se agrupar esses dois gêneros com *Hanseniaspora* e *Kloeckera* (ambos com o sistema Q-6) (YAMADA et al., 1980).

O gênero *Sterigmatomyces* composta das seis espécies *S. nectari*, *S. elviae*, *S. halophilus*, *S. penicillatus*, *S. polyborus* e *S. tursiopsis*, foram divididas em dois grupos. O primeiro grupo compõe-se das linhagens com o sistema Q-9 e o segundo com o sistema Q-10. As diferenças morfológicas e características taxonômicas levaram a distinguir os dois grupos a nível genérico. Linhagens que apresentaram o sistema Q-10 juntamente com a conídia ramificada do esterigma foi transferido a um novo gênero, as *Fellomyces*, gerando as novas espécies *Fellomyces nectari* (origem *S. nectari*), *Fellomyces penicillatus* (antes *S. penicillatus*) e *Fellomyces polybarus* (*S. polybarus*) (YAMADA & BANNO, 1984).

3 - MATERIAL E MÉTODOS.

3.1 - Localização e descrição dos locais de coleta.

Os pontos de amostragem escolhidos para o presente trabalho foram três pontos distintos ao longo do Rio Una do Prelado na Estação Ecológica de Juréia-Itatins (APÊNDICE 3), a saber: rio (próximo a Cachoeira do Carvalho), mangue (localizado entre a cachoeira do Paraíso e Ilha do Ameixal) e estuário (localizada próxima as praias Barra do Una e Praia do Una), que se encontram interligados, sofrendo influência direta das marés e nutrientes, variando os parâmetros como salinidade, teor de ácido húmico, pH e outros. No local de cada ponto de coleta foram determinados a largura e profundidade da área de coleta e a temperatura da água. As áreas de amostragem para os diferentes pontos de coleta estão indicadas a seguir (TABELA 1).

TABELA 1: Pontos de amostragens no local de estudo e temperatura d'água.

	Rio (Ponto 1)		Mangue (Ponto 2)		Estuário (Ponto 3)	
	1ª coleta	2ª coleta	1ª coleta	2ª coleta	1ª coleta	2ª coleta
T°C	23,2	25,9	20,2	27,2	21,8	26,3
Prof (m)	5,24	5,62	5,36	2,30	4,23	nd.
Larg (m)	0,50	0,66	1,13	0,71	1,21	0,70

3.2 - Coleta das amostras.

Foram realizadas duas coletas respectivamente na primeira semana de novembro de 1991 (02/11/1991) e na última semana de janeiro de 1992 (30/01/1992) nos três pontos de amostragem (TABELA 2).

As amostras foram coletadas assepticamente em garrafas estéreis de 1 litro e mantidas a baixa temperatura em recipientes térmicos até serem trabalhadas em laboratório.

TABELA 2: Dados de coleta dos dias 02/11/1991 e 30/01/1992.

	dia 02/11/91	dia 30/01/92 *
início da coleta:	7:00 hs	7:25 hs
término:	9:50 hs	9:50 hs
maré Porto Santos:	0,1m (05:49 hs, maré baixa)	0,7m (6:43hs)
maré baixa:	1,1m (13:09 hs, pico de maré)	1,0m (13:08hs)

(*)coleta sob incidência de chuva.

3.3- Caracterização físico-química das amostras.

Assepticamente foram separadas alíquotas das amostras para determinação do pH, salinidade, teor de fósforo e de nitrogênio.

3.4- Origem das leveduras estudadas.

Setenta linhagens de leveduras isoladas ao longo do projeto “Pesquisa da Microbiota da Estação Ecológica de Juréia-Itatins” da Coleção de Culturas Tropical foram selecionados para o presente trabalho. Os substratos variam de plantas, solo e água de rios. Os códigos das linhagens que se encontram depositadas na Coleção de Culturas Tropical (CCT) estão listados no APÊNDICE 2 e foram isolados pelo seguinte método:

Alíquotas de 10 mL de cada amostra foram colocadas em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio líquido “MLA modificado” (6,0% de dextrose, 3,5% de cloreto de sódio, 0,5% de sulfato de amônio; 0,68% de fosfato monobásico de

potássio; 0,5% de extrato de levedura; 0,005% de ácido nalidixico, 0,005% de ampicilina, pH=4.0) (SCHRANK, 1982) e “Sabouraud modificado” (2,0% de glicose, 1,0% de peptona, 0,5% de extrato de levedura, 0,005% de ácido nalidixico, 0,005% de ampicilina, pH final = 4.0) (HAGLER, 1978) para o isolamento das leveduras. Cerca de 250 mL das amostras foram filtradas em membrana Millipore (0,8 µ). As membranas foram cortadas ao meio e cada parte colocada assepticamente sobre os meios sólidos para isolamento em placa (MLA e Sabouraud modificado).

Os tubos de ensaio inoculados foram incubados a 25°C por 5 a 10 dias. Dos tubos onde houve crescimento foram retiradas alíquotas de 0,1 mL que foram transferidas para placas de Petri com meio sólido para isolamento e, com auxílio de uma alça de inoculação, foram feitas estrias de esgotamento.

As placas contendo as membranas e as placas com as estrias de esgotamento foram incubadas a 25°C por 3 a 5 dias. As colônias de leveduras que se desenvolveram nestas placas foram repicadas até sua purificação. As colônias morfológicamente distintas foram caracterizadas, codificadas e transferidas para tubos contendo “GYMP” (2,0% de glicose, 0,5% de extrato de levedura, 1,0% de extrato de malte, 0,2% de fosfato de sódio monobásico e 2,0% de ágar, pH=5,5) (HAGLER, 1978). Após o desenvolvimento, foram cobertas com óleo mineral e mantidas à temperatura ambiente para posterior identificação.

3.5- Identificação e taxonomia de leveduras.

3.5.1- Considerações gerais.

As 70 linhagens isoladas, após purificadas, foram identificadas de acordo com a metodologia recomendada por KREGER-VAN-RIJ (1984), BARNETT et al. (1990, 1983); DOMSCH et al. (1993), LODDER (1970). Outros trabalhos

dedicados a identificação de leveduras, como APOLINÁRIO & MILANEZ (1986a, 1986b), HAGLER & MENDONÇA-HAGLER (1991a), PEÇANHA (1993), PRADA (1994) e CASTRO (1995), também foram consultados.

3.5.2- Características de reprodução vegetativa e crescimento em meio líquido.

Características morfológicas como arranjo, forma das células e o tipo de divisão celular foram observados através da análise em microscópio após o crescimento das linhagens em meio líquido GYP (2,0% de glicose, 0,5% de extrato de levedura, 1,0% de peptona) a 27°C por 24 horas. Características como formação de sedimento, película e anel foram observadas periodicamente também neste meio (7, 14 e 21 dias).

As culturas foram inoculadas em GYP ágar (2,0% de glicose, 0,5% de extrato de levedura, 1,0% de peptona e 2,0% de ágar) e incubadas a 27°C por 48 a 72 horas. Foram observadas características das colônias como: coloração, cor, brilho, textura, forma, margem, superfície e o tipo de elevação, utilizando-se estereoscópio.

3.5.3- Microcultivo.

Algumas leveduras apresentam a característica de formar pseudomicélio, micélios verdadeiros e/ou artrósporos em determinados meios de cultura. Culturas de leveduras foram inoculadas na forma de um risco em placas de Petri contendo meio de CMA (Corn Meal Ágar - Difco) e recobertas com laminulas estéreis para a observação destas características. As placas foram incubadas a 27°C e observadas em microscópio óptico após 5 a 7 dias de incubação. Em algumas linhagens foi possível observar também a formação de esporos sexuais.

3.5.4- Formação de balistosporos.

Para observar a formação de balistosporos, utilizou-se a técnica de duas placas de Petri unidas por uma fita adesiva, onde uma contem meio pobre em nutrientes (CMA) e a outra contem meio rico (GYP ágar). A cultura foi inoculada formando um "X" na placa contendo meio CMA. Depois foi sobreposto o fundo da placa contendo CMA ao fundo da placa contendo GYP ágar. Uma lâminula estéril foi colocada sobre o meio GYP ágar, na mesma direção do inóculo. Assepticamente, as duas bases das placas de Petri foram unidas com fita adesiva. O conjunto de placas foi incubado a 27°C durante 30 dias. Onde ocorreu um crescimento na placa com meio GYP ágar exatamente igual ao desenho contido na placa com meio CMA, houve formação de balistosporos. Estes foram liberados da cultura CMA (formando uma imagem espelho). Para as culturas que apresentaram a formação de balistosporos, foram preparadas lâminas à fresco utilizando-se as lamínulas colocada sobre o meio rico e foi observada a morfologia dos balistosporos.

3.5.5 - Característica da Reprodução Sexuada.

A produção de esporos sexuais foi verificada através de análise microscópica das linhagens em placas com meio Acetato ágar de Mc. Clary (0,1% de glicose, 0,18% de cloreto de potássio, 0,25% de extrato de levedura, 0,82% de acetato de sódio e 1,5% de ágar). A incubação foi feita a 27°C e observações em microscópio foram realizadas em intervalos de 5, 7, 14, 21, 30 e 40 dias. As culturas que não apresentaram produção de esporos, foram novamente incubadas em meios de esporulação como YM ágar (0,3% de extrato de levedura, 0,3% de extrato de malte, 0,5% de peptona, 1,0% de glicose e 2,0% de ágar) e Extrato de Malte (5,0% de extrato de malte e 3,0% de ágar) por período de 30 dias, sendo que as observações por microscopia foram realizadas semanalmente.

3.5.6 - Testes fisiológicos e bioquímicos.

Determinadas as principais características morfológicas das culturas, foram realizados os testes fisiológicos e bioquímicos.

3.5.6.1- Fermentação de carboidratos.

As linhagens foram testadas quanto à habilidade em fermentar diferentes carboidratos. As culturas que inicialmente demonstraram capacidade para fermentar a glicose foram em seguida testadas quanto à capacidade de fermentar alguns dissacarídeos como maltose, sacarose, lactose, trissacarídeos como a rafinose e hexose como a galactose. Os açúcares foram esterilizados por filtração (Millipore) em membranas de celulose (0,22 μ m) e estocadas em soluções a 6%, exceto a rafinose que foi estocada a 12%.

Em tubos de ensaio contendo 2 mL de meio Basal (0,45% de extrato de levedura, 0,75% de peptona e solução azul de bromotimol até a coloração verde garrafa) acrescido de 1,0 mL do carboidrato de interesse. Foram inoculadas 0,1 mL da suspensão celular das culturas (com crescimento de 24 hs em GYP a 27°C). As leituras foram realizadas diariamente, observando-se a produção de ácido através da mudança de coloração do meio basal para amarelo e a formação de gás capturado no interior do tubo de Durham. As observações foram feitas por um período máximo de 21 dias. O potencial fermentativo foi registrado, considerando-se:

positivo: tubo de Durham com 1/3 a 3/3 de gás em 1 a 3 dias de incubação.

lento: tubo de Durham com 1/3 a 3/3 de gás em período superior a 3 dias.

fraco: tubo de Durham com apenas bolhas de gás

negativo : ausência de produção de gás.

3.5.6.2 - Testes empregando a técnica de "Replica Plate".

Utilizou-se a técnica de "replica plate" para testes de assimilação de compostos de carbono, assimilação de compostos nitrogenados, teste de crescimento a 37°C, resistência à pressão osmótica (osmotolerância), teste de

"DBB" e síntese de compostos semelhantes ao amido, resistência a cicloheximida (HAGLER et al., 1993; PEÇANHA, 1993; PRADA, 1994; CASTRO, 1995).

A técnica do "replica plate", utilizada neste trabalho consiste no emprego de um multi-inoculador, desenvolvido no "Laboratório de Taxonomia e Ecologia Microbiana" do Instituto de Microbiologia de U.F.R.J., que permite inocular 25 culturas diferentes em uma mesma placa de Petri (HAGLER et al., 1993).

O inóculo utilizado para os testes foi preparado a partir de culturas crescidas em GYP ágar por 48 horas, que foram transferidas para tubos contendo "Yeast Nitrogen Base" (YNB) (0,67%) e 0,1% de glicose, onde permaneceram por 5 dias a 27°C, sendo agitados diariamente para exaurir suas reservas nutritivas. Decorrido esse período, aliquotas de cerca de 0,3mL dessa suspensão celular foram transferidas para os orifícios da placa matriz do multinoculador, para serem inoculados nas placas testes.

Para a caracterização das linhagens isoladas foram testadas várias fontes de carbono, entre elas: glicose, galactose, L-sorbose, L-ramnose, sacarose, maltose, celobiose, trealose, lactose, melibiose, rafinose, melizitose, amido solúvel, inulina, D-xilose, L-arabinose, D-arabinose, D-ribose, eritritol, ribitol (adonitol), D-manitol, inositol, metanol, etanol, glicerol, galactitol (dulcitol), D-glucitol (sorbitol), ácido succínico, ácido cítrico, ácido DL-lático e salicina.

As placas foram incubadas por 21 dias a 25°C em estufa incubadora para Demanda Biológica de Oxigênio. Foram realizadas três leituras, com intervalos de 7, 15 e 21 dias de incubação. Foram utilizados como controle positivo uma placa com YNB ágar e glicose e como controle negativo placas somente com YNB ágar ou YCB ágar.

Foram utilizadas as seguintes culturas padrão para a confirmação e comparação dos resultados: *Trichosporon beigeli* (original) CCT 1903 (=ATCC 46446), *Pichia pastori* CCT 2644 (= DSM 703820 = ATCC 28485), *Candida edox* CCT 2637(= DSM 70751 = ATCC 18414), *Hansenula candensis* CCT 2636

(=DSM 70281 = ATCC 14355), *Torulopsis glabrata* CCT 0730, *Kluyveromyces lodderii* CCT 0777 (= NCYC 1417 = CBS 2757), *Kloeckera apiculata* CCT 0774 (=ATCC 18212), *Candida methylica* CCT 1992(= ATCC 56294 = UKM-F 1144), cedidas pela Coleção de Culturas da "Fundação de Pesquisa e Tecnologia André Toselo" em Campinas.

3.5.6.2.1- Assimilação de compostos nitrogenados.

As respectivas fontes de nitrogênio foram testadas: Nitrato de potássio (0,78g/100mL); Nitrato de sódio (0,26g/100mL); L-lisina (0,56g/100mL) e Etilamina (0,64g/100mL).

3.5.6.2.2- Crescimento em meio sem vitaminas.

Foi realizado incubando-se as culturas em "Vitamin Free Base" ágar (VFB - DIFCO).

3.5.6.2.3 - Osmotolerância a 50% de glicose e a 10% de NaCl.

Para o teste de osmotolerância foram utilizados os meios: GYP "Sabouraud" ágar + 50% de glicose (50,0% de glicose, 1,0% de extrato de levedura e 3,0% de ágar) e o meio contendo alta concentração de sal (10,0% de cloreto de sódio, 5% de glicose, 10mL de solução de YNB e 2,0 de ágar). O teste de tolerância a alta concentração de açúcar foi realizado com meio sólido e o teste de tolerância a alta concentração de sal foi realizado pela técnica de "replica plate". As placas e os tubos foram incubados a 27°C e as leituras realizadas em 7, 14 e 21 dias de incubação.

3.5.6.2.4- Resistência à cicloheximida.

A habilidade das leveduras em suportar altos teores de cicloheximida (actidiona) foi verificada utilizando-se a técnica de "replica plate". A cicloheximida foi testada nas concentrações de 100 e 1000ppm.

3.5.6.2.5- Crescimento a 37°C.

Foi verificada a capacidade de crescimento das culturas a 37°C utilizando-se GYP líquido. Os tubos de ensaio foram inoculados e incubados em Banho Maria. As leituras foram realizadas através da verificação de turbidez do meio após 48 horas de incubação.

3.5.6.2.6-Teste de Diazonium Blue B (DBB).

O teste de coloração de DBB foi observado em placa contendo GYP ágar. A cultura de interesse foi observada após 28 dias de crescimento a 27°C. Foram adicionados sobre a cultura de levedura gotas do sal DBB (o-dianisidine tetrazotized, Sigma) dissolvido em solução tris (0,25 M/ pH= 7,0) sobre condições rigorosas de refrigeração. Após 1 a 2 minutos foi feita a leitura do teste. Se a cultura apresentou coloração vermelho escuro ou violeta após a adição do DBB a reação foi considerada positiva. Foi considerada negativa quando não houve alteração de cor.

3.5.6.2.7 - Síntese de compostos amilóides.

As placas utilizadas como controle positivo (YNB ágar + glicose) no teste de assimilação de compostos de carbono foram utilizadas para verificar a síntese de compostos amilóides. Após 21 dias de incubação as placas foram recobertas com solução de lugol durante alguns minutos. Em resultados positivos a colônia adquiriu uma coloração azulada.

3.5.6.3-Hidrólise de uréia.

A habilidade em hidrolizar uréia foi verificada pela inoculação das culturas em meio Uréia ágar (0,1% de glicose, 0,1% de peptona, 0,5% de NaCl, 0,2% KH₂PO₄, 1,0 mL de solução 0,12% de vermelho de fenol e 2,0% de ágar, pH= 6,8). O crescimento a 27°C por 5 a 7 dias considerou-se como resultado positivo as

culturas que apresentaram mudança na coloração do meio de cultura, passando de amarelo para rosa intenso.

3.5.6.4 - Atividade de arbutina.

As linhagens de leveduras foram inoculadas em Arbutina ágar (0,5% de arbutina, 0,5% de extrato de levedura, 2,0% de ágar e 1 mL de solução 1,0% de citrato férrico de amônia) a fim de verificar a habilidade de hidrolisar arbutina. Após a incubação a 27 °C durante 5 a 7 dias foi observado a mudança de coloração do meio de cultura de branco para marrom escuro, considerando-se como resultado positivo.

3.5.6.5- Produção de ácido.

As culturas foram inoculadas também em meio de CaCO₃ ágar (0,5% de extrato de levedura, 0,5% de glicose, 0,5% de carbonato de cálcio e 2,0% de ágar). As culturas que produziram halos translúcidos após 7 dias de incubação a 27°C foram considerados como produtoras de ácido a partir de glicose.

3.5.7- Análise de Coenzima Q (quinonas).

Este teste foi baseado na metodologia descrita por YAMADA & KONDO (1972), com algumas modificações realizadas por BILLON-GRAND, 1989, SUZUKI et al., 1991, WEIJMAN et al., 1988; YAMADA & KONDO, 1973.

Para o isolamento, purificação e identificação e isolamento da coenzima Q foi utilizado o seguinte material:

Reagentes:

Pyrogallol (ácido pirogálico P.A.) - Vetec -Química Fina L.T.D.A.

Hidróxido de sódio P.A. - Grupo Química

Metanol lichrosolv - Merck

Hexano - Merck

Acetona - Lichrosolv - Merck

Benzeno P.A. - Merck

Éter isopropílico - Licrhosolv - Merck

Lã de vidro

Ubiquinonas (Coenzima-Q) - Sigma

Q-6 (sigma C 9504)

Q-7 (sigma C 0139)

Q-9 (sigma C 9888)

Q-10 (sigma C 9629)

Instrumentos:

Condensador Pirex, com banho termostático - Eyela

Evaporador rotatório - Eyela

Funil de separação

Funil (5 - 7 de diâmetro)

Papel de filtro - Whatmann nº 1 e nº 2

Frasco de Erlenmeyer (500 mL)

Pipetas de 5 mL ou similar

Pipeta capilar (Pipeta Pasteur) - Iwaki Glass

Cromatografia de camada delgada (TLC)

Merck Kiesegel 60 F254 20 x 20 cm. , 0,25 de largura

solvente: benzeno

Cuba de vidro para cromatografia ascendente

Ultra centrifuga refrigerada - Himac CR 2

Shaker New Brunswick Scientific

3.5.7.1 - Procedimento.

3.5.7.2 - Preparo da biomassa.

Foi inoculado em meio GYP “Sabouraud” ágar em forma de estria de esgotamento em placa de Petri a 27°C durante 48 horas. Após o crescimento a cultura foi transferida num Erlenmeyer contendo 400mL de meio caldo “YM broth”

modificado (0,3% de extrato de levedura, 0,3% de extrato de malte, 0,5% de peptona, 0,5% de glicose e pH = 7,0), e incubada em shaker rotatório (New Brunswick Scientific) a 27°C, 150 rpm por 72 h.

Depois de crescidas, as culturas foram submetidas ao processo de lavagem por três vezes. A etapa consistiu de centrifugação em centrífuga refrigerada (Himac CR 2) a 4°C, 9.000 rpm por 15 minutos. O precipitado foi ressuspenso em uma solução de concentração salina 0,9% e re-centrifugada. As duas lavagens seguintes foram feitas a 15.000 rpm por 20 minutos a 4°C. A biomassa resultante foi armazenada em condições de refrigeração.

3.5.7.3 - Isolamento e Purificação da coenzima-Q.

3.5.7.3.1- Isolamento da coenzima-Q.

O procedimento utilizado no isolamento de ubiquinonas consistiu em:

- 1- Suspender a biomassa em um frasco de refluxo (de 1000mL), em 20 mL de água, 2 gramas de pirogalol, 60 mL de metanol e 3 gramas de hidróxido de sódio, durante 60 minutos a 92°C sob refluxo.

- 2- Resfriar a suspensão.

- 3- Extrair num funil de separação, adicionando 10 mL de água e 40 mL de hexano.

- 4-Recolher a fase aquosa e retornar ao funil de separação para prosseguir por mais duas vezes a extração, coletando a fase apolar, no final da terceira.

- 5- lavar os extratos com água destilada (40 mL) por 3 vezes.

- 6- Adicionar uma pequena porção de sulfato de sódio anidro na solução.

- 7- Filtrar a solução.

- 8- Evaporar o extrato sob pressão reduzida, até secagem completa.

- 9- Dissolver o resíduo com uma pequena porção de acetona e evaporar sob pressão reduzida até secar novamente.

3.5.7.3.2- Purificação da coenzima-Q.

O procedimento utilizado na purificação de ubiquinonas consistiu em:

- 1- Dissolver o resíduo numa pequena porção de acetona.
- 2- Aplicar em uma placa de cromatografia de camada delgada (mistura padrão como referência) e desenvolver com benzeno.
- 3- Secar a placa, coletar a zona amarela (azul púrpura sob lâmpada U.V.).
- 4- Extrair o resíduo em acetona e filtrar.
- 5- Evaporar a solução sob pressão reduzida, até secagem completa.
- 6- Dissolver o resíduo em acetona e filtrar em membrana Millipore.

3.5.7.3.3- Identificação da coenzima-Q.

A identificação de ubiquinonas foi realizada em um cromatógrafo a líquido de alta eficiência (marca Shimadzu). As condições utilizadas foram:

- Fase móvel; metanol: álcool isopropílico (2:1, v/v)
- Coluna: Zorbax ODS, 4,6 mm x 25 cm (Du Pont)
- Detector: U.V., com detecção em 275 nm.
- Volume injetado: 3-4 μ l
- Vazão da fase móvel: 1mLmin⁻¹

O padrão de ubiquinona foi injetado nas mesmas condições da amostra.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Área de amostragem e caracterização físico-química das amostras.

Os dados físicos-químicos das amostras coletadas, como pH, temperatura da água, percentual de salinidade e concentração de nitrogênio e fósforo estão apresentados na TABELA 3.

TABELA 3: Dados físico-químicos das amostras coletadas no rio Una do Prelado.

testes	Rio (Ponto 1)		Mangue (Ponto 2)		Estuário (Ponto 3)	
	1ª coleta	2ª coleta	1ª coleta	2ª coleta	1ª coleta	2ª coleta
pH	5,30	4,6	7,50	6,7	7,70	7,0
S ‰	0,0	4	16,25	10,0	17,25	13,5
P (ppm)	42,69	29,71	41,44	29,71	36,93	26,75
N (ppm)	0,19	0,28	0,07	0,38	0,09	0,32

4.2 - Identificação das leveduras em nível genérico.

Das 78 linhagens de leveduras selecionadas, oito não puderam ser reativadas após dois anos de preservação em óleo mineral. Destas linhagens que não resistiram ao armazenamento, cinco eram de cor branca, duas de coloração vermelha e uma de cor creme; cinco foram isoladas do rio, duas do mangue e uma do estuário.

No trabalho de caracterização e classificação foram utilizadas as 70 linhagens viáveis (TABELA 4).

TABELA 4: Total de leveduras coletadas nos pontos de amostragem.

<i>local de coleta</i>	<i>coleta dia 01/11/91</i>	<i>coleta dia 30/01/92</i>	<i>total de leveduras coletadas</i>
Rio	11	13	24
Mangue	9	13	22
Estuário	12	12	24
total	32	38	70

Das leveduras isoladas viáveis, treze cresceram tanto em meio "MLA" como em "Sabouraud modificado" (APÊNDICE 1). Ambos os meios foram eficientes em relação ao isolamento, sendo "MLA" com 48,6% isolados e "Sabouraud modificado" com 32,8% isolados.

Comparando os dados físico-químicos da água do rio Una entre as coletas foi possível observar em comparação com dados da 1ª coleta que na segunda coleta o valor do pH abaixou (provavelmente devido ao aumento de detritos e ou nutrientes carreados pela chuva), a temperatura aumentou (devido à própria época do ano), a salinidade diminuiu (através da incidência de fortes chuvas nos dois dias precedentes da 2ª coleta), diminuição da concentração de fósforos e um aumento considerável na concentração de nitrogênio (provavelmente devido o acréscimo de nutrientes orgânicos carreados pela chuva ou pela mudança de maré), foi suficiente para um aumento considerável (10%) na diversidade microbiana de leveduras na 2ª coleta, condicionando uma acentuada adaptação e proliferação das leveduras em ambientes marinhos. No ponto coletado em rio de água doce, aumentou ligeiramente a salinidade, provavelmente as marés foram mais fortes e entrando no percurso do rio. O rio possui uma elevação extremamente baixa (em torno de 4 metros), resultando uma onda de maré percebida nos quase 80 Km de percurso, ficando a água salgada sentida nos 15 Km acima ou mais (POR et al., 1984).

4.2.1 - Identificação das leveduras isoladas do rio.

As 24 linhagens de leveduras isoladas no rio Una (FIGURA 1), foram classificadas como pertencentes aos seguintes gêneros: *Candida* (55%), *Rhodotorula* (21%), *Sporobolomyces* (8%), *Cryptococcus* (8%), *Saccharomyces* (4%) e *Trichosporon* (4%).

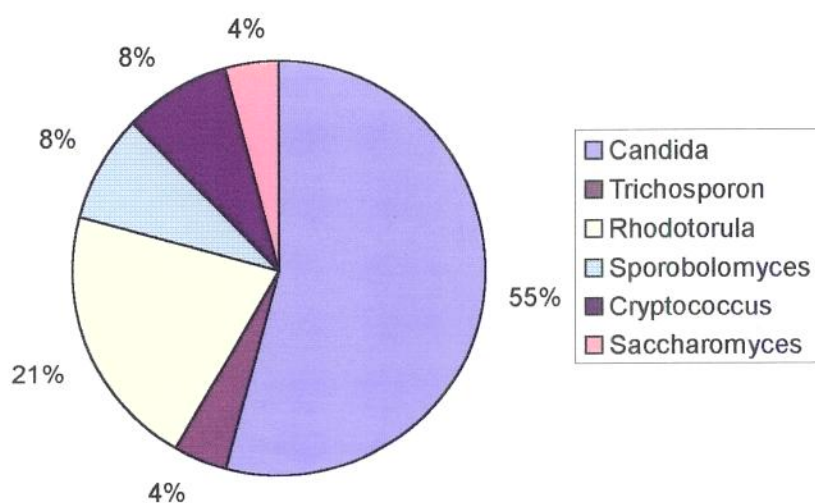


FIGURA 1: Gêneros de leveduras isoladas na região do rio.

4.2.2 - Identificação das leveduras isoladas do mangue.

Da região do mangue, foram isoladas 22 linhagens de leveduras, que foram distribuídas em 7 gêneros distintos: *Candida* (72%), *Zygosaccharomyces*, *Aureobasidium*, *Fellomyces* (*Sterigmatomyces*), *Sporobolomyces* (todas com 5%), *Williopsis* (*Hansenula*) e *Kluyveromyces* (ambas com 4%). Neste ponto de coleta houve uma predominância absoluta do gênero *Candida* (FIGURA 2).

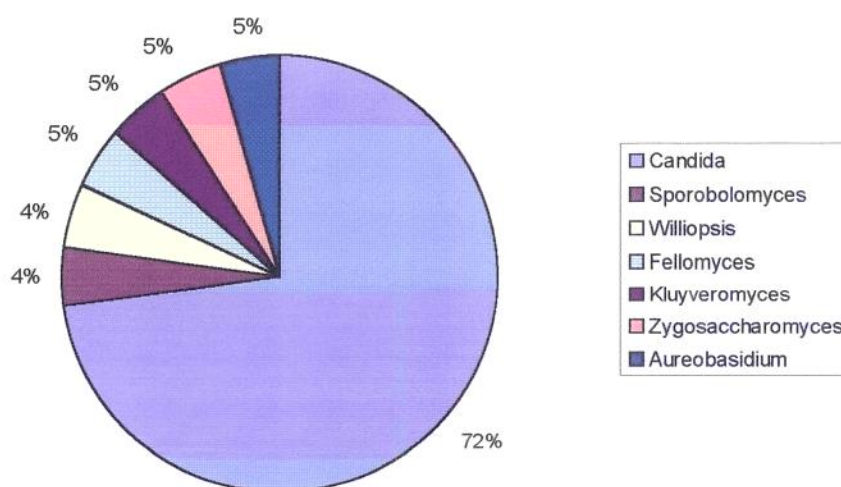


FIGURA 2: Gêneros de leveduras isoladas do mangue.

4.2.3 - Identificação das leveduras isoladas do estuário.

Da região de maior salinidade (estuário) foram isoladas 24 linhagens de leveduras que foram classificadas em cinco gêneros: *Candida* (71%), *Rhodotorula* (17%), *Williopsis* (*Hansenula*), *Aureobasidium* e *Kluyveromyces* (com 4% cada). O gênero *Candida* foi o dominante, neste local de coleta (FIGURA 3).

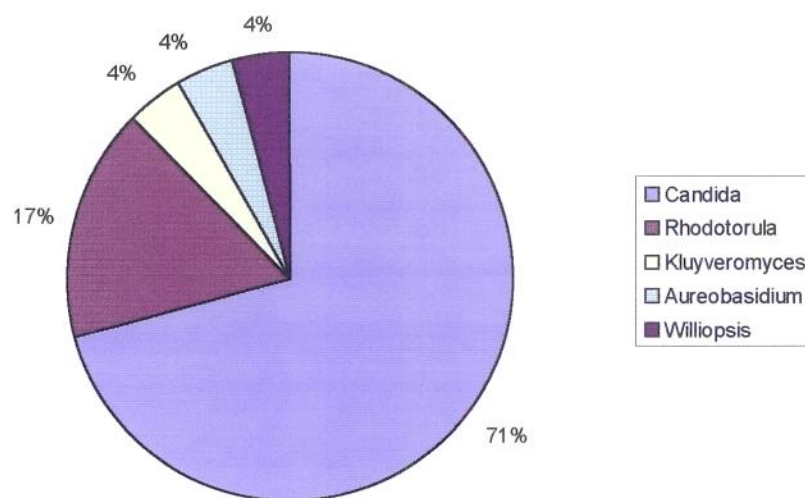


FIGURA 3: Gêneros de leveduras isoladas no estuário.

4.2.4 - Identificação das leveduras em nível genérico nos três pontos de coleta.

Nos três pontos estudados, o gênero *Candida* foi o mais frequente (rio 55%, mangue 72% e estuário 71%), totalizando 67% das linhagens isoladas, seguidas do gênero *Rhodotorula* com 13%, *Sporobolomyces* com 4%. Os demais gêneros classificados estão distribuídos entre os 16% restantes: *Williopsis* (*Hanseula*), *Kluyveromyces*, *Cryptococcus*, *Saccharomyces*, *Fellomyces*, *Trichosporon* e *Zygosaccharomyces* (FIGURA 4).

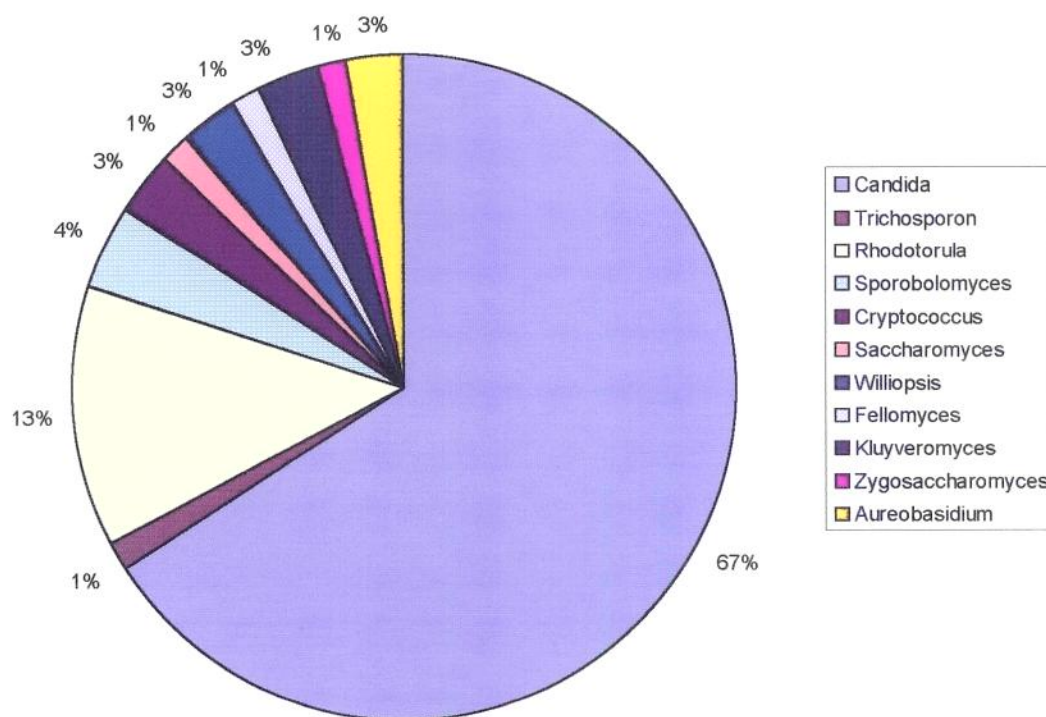


FIGURA 4: Ocorrência das leveduras considerando-se os três pontos de coleta.

As leveduras imperfeitas prevaleceram com 91% do total das leveduras isoladas, incluindo os estados anamorficos de leveduras ascomicéticas e basidiomicéticas. O restante (9%) foram identificadas como leveduras ascomicéticas (produtoras de esporos), como: *Williopsis*, *Kluyveromyces* e *Saccharomyces* e *Zygosaccharomyces*.

Dentre as linhagens, 74% tiveram resposta negativa ao teste de "DBB" e hidrólise de uréia apresentaram um comportamento típico das leveduras ascomicéticas. Duas linhagens (as linhagens 495 e 500) apresentaram resultados inconclusivos, com resposta positiva para uréia e negativa para "DBB". As linhagens restantes (25,7% do total), DBB e uréia positivas foram classificadas como basidiomicéticas e anamorfos afins (TABELA 7).

Os gêneros *Fellomyces*, *Cryptococcus*, *Aureobasidium* e *Trichosporon* se caracterizaram pela produção de micélio verdadeiro. O gênero *Trichosporon* apresentou a produção de artrósporos. As linhagens produtoras de pseudomicélio foram enquadradas principalmente nos gêneros *Candida* e *Williopsis*, representando 50% do total das leveduras isoladas.

Das linhagens com afinidade ascomicéticas 68,6% foram fermentativas, destas 27% fermentaram exclusivamente glicose. As linhagens restantes fermentaram em ordem decrescente os açúcares sacarose, galactose, maltose e rafinose.

Das linhagens, 31% assimilaram nitrato como única fonte de nitrogênio, 29% cresceram à 37°C e 30% cresceram em meio livre de vitaminas.

A osmotolerância foi uma característica muito freqüente entre as leveduras analisadas, 45,7% das linhagens cresceram em alta concentração de sal (na presença de 10% de NaCl), e 80,0% cresceram em meio com alta concentração de açúcar (com 50% de glicose), 64,3% hidrolisaram arbutina.

4.3 - Identificação de leveduras em nível de espécies

As 70 linhagens isoladas neste trabalho foram classificadas em 35 espécies diferentes. Duas linhagens apresentaram características leveduriformes. Os resultados de classificação ao nível de espécie obtidos por identificação convencional (microscopia e testes bioquímicos) estão indicadas na TABELA 7. Considerando-se a importância e predominância do gênero *Candida*, foram realizados testes do perfil de coenzima-Q para enquadramento das linhagens levando-se em conta os tipos de coenzimas apresentados.

4.3.1 - Identificação do gênero *Candida* em nível de espécie.

Resultados da identificação ao nível específico indicaram uma grande diversidade de espécie, com 21 espécies distintas, de um total de 46 linhagens isoladas. *Candida sake* e *Candida pintolopesii* var. *pintolopesii* foram as espécies predominantes, as demais apresentaram uma ocorrência menor (TABELA 5). Todos os resultados dos exames morfológicos, fisiológicos e bioquímicos estão apresentados na TABELA 7, os resultados da análise de quinonas estão apresentados na TABELA 5, os locais de coleta para as leveduras classificadas ao longo do Rio Una apresentados na TABELA 6. O agrupamento das linhagens de acordo com o tipo de coenzima Q resultou na distribuição apresentada na TABELA 5 (dados completos da análise estão representados na TABELA 8). Os resultados confirmaram a identificação convencional.

Todos os resultados de coenzima-Q foram comparados e concordam com os dados descritos nas literaturas de referência, estudos anteriores (KREGER VAN RIJ 1984, BARNETT 1990; MONTRACHER et al., 1990) e no Catálogo de Culturas da Japan Collection of Microorganism (1994).

TABELA 5: Ocorrência, frequência e perfil de quinonas das espécies do gênero *Candida* isoladas ao longo do Rio Una do Prelado.

<i>Espécie (Candida)</i>	<i>ocorrência N^o</i>	<i>Frequência(%)</i>	<i>Perfil de coenzima-Q</i>
<i>C. sake</i>	5	11	Q-9
<i>C. pintolopesii var pintolpesii</i>	5	11	Q-6
<i>C. famata</i>	4	9	Q-9
<i>C. quercitrusa</i>	3	7	Q-9
<i>C. valida</i>	3	7	Q-7
<i>C. guilliermondii</i>	3	7	Q-9
<i>C. biodinii</i>	2	4	Q-7
<i>C. bombi</i>	2	4	Q-9
<i>C. citrea</i>	2	4	Q-7
<i>C. nitrativorans</i>	2	4	Q-9
<i>C. torresii</i>	2	4	Q-9
<i>C. versatilis</i>	2	4	Q-9
<i>C. atmosphaerica</i>	1	2	nd
<i>C. bacarum</i>	1	2	nd
<i>C. friedrichii</i>	1	2	nd
<i>C. fructus</i>	1	2	nd
<i>C. parapsilosis</i>	1	2	Q-9
<i>C. pseudointermedia</i>	1	2	Q-9
<i>C. solani</i>	1	2	Q-7
<i>C. sonkii</i>	1	2	nd
<i>C. tannotolerans</i>	1	2	nd
<i>Candida sp A</i>	1	2	Q-7
<i>Candida sp B</i>	1	2	Q-7

Candida sake: as linhagens 26, 32, 87, 90 e 244 foram identificadas como *Candida sake*. A linhagem 26 apresentou resposta negativa na assimilação de D-xilose (positivo na descrição) e apresentou resposta fraca na assimilação do ácido succínico e ácido láctico (ambos positivo na descrição). A linhagem 32 apresentou resposta fraca ao teste de assimilação do ácido láctico (positivo na descrição). A linhagem 90 obteve resposta fraca na assimilação da rafinose (negativo na descrição). A linhagem 244 apresentou resposta fraca no teste de assimilação da rafinose e L- ramnose (ambos positivos na descrição). As cinco linhagens apresentaram Q-9 em maior porcentagem estando de acordo com resultado obtido por VILJOEN & KOCK (1989). Esta espécie foi estudada em ambientes aquáticos (baías, lagoas, oceano e mar) em trabalhos realizados por BARNETT (1990), KREGER VAN RIJ (1984), KOHLMAYER & KOHLMAYER (1979), VAN UDEN & FELL (1968). Está frequentemente associada a algas do mar (*Chlorophyta*, *Rhodophyta*), espécies de peixes, salmão congelado (KREGER VAN RIJ, 1984), em fruta cítrica (SUZUKI et al., 1991). Na Estação Ecológica de Juréia-Itatins a *Candida sake* foi isolada de frutos imaturos de duas espécies do gênero *Guateria*, *Guateria sp A* e *a Guateria hilariana* (PRADA, 1994).

Candida pintolopesii variedade *pintolopesii*: as linhagens 36, 285, 291 e 502 foram identificadas como *Candida pintolopesii* variedade *pintolopesii*. As linhagens 36, 356 e 291 apresentaram resposta positiva para o teste de assimilação da salicina (negativo na descrição), a linhagem 356 apresentou resposta positiva para ácido succínico (negativo na descrição) a linhagem 36 apresentou resposta fraca a salicina (negativo na descrição) e não cresceu à 37°C (positiva na descrição). As linhagens estudadas apresentaram a coenzima Q-6 em maior porcentagem. Esta espécie foi descrita em frutos maduros de *Psychotria nuda*, na própria Estação Ecológica de Juréia-Itatins (PRADA, 1994), em ambientes aquáticos (Ribeirão Rio Claro) (PEÇANHA, 1993) e em solo (KREGER VAN RIJ, 1984).

Candida famata: as linhagens 31, 38, 39 e 43 foram identificadas como *Candida famata*. A linhagem 31 fermentou fracamente a galactose (negativo na descrição) e não assimilou glicerol (positivo na descrição). As linhagens 38, 39 e 43 apresentaram resposta fraca ao ácido succínico e as linhagens 38 e 39 apresentaram resposta fraca ao ácido láctico. As quatro linhagens são arbutinas positivas, não utilizam nitrato de potássio como única fonte de nitrogênio e são DBB negativos. Todas possuem a Q-9 em maior porcentagem. O estado perfeito desta levedura é a espécie *Debaryomyces hansenii*. Esta espécie foi estudada em trabalhos associados a insetos, ar, ambientes aquáticos por diferentes autores (BARNET et al., 1990; KREGER VAN RIJ, 1984; FELL & VAN UDEN, 1968) em ambientes aquáticos poluídos (SILVA FILHO, 1988; APOLINÁRIO, 1984; PEÇANHA, 1993), em insetos (mariposa, *Sigelgatia sp*) e na água acumulada em Bromélias na restinga do Rio de Janeiro (ROSA, 1993). Na Estação Ecológica de Juréia-Itatins foi isolada de uma espécie de angiosperma (*Leandra mosenii*) (PRADA, 1994). Esta espécie também foi encontrada na da bacia do Rio de Janeiro no estômago de camarão (*Peneaus schimitti*) (PAGNOCCA et al., 1989), e em flor (TOKUOKA & ISHITANI, 1991). Estes dados de literatura indicam que a espécie possui uma boa adaptação a ambientes aquáticos.

Candida guilliermondii: as linhagens 42, 85 e 491 foram identificadas como *Candida guilliermondii*. A linhagem 42 apresentou resposta fraca à prova no teste de assimilação do amido (negativo na descrição) e nos testes de ácido succínico, ácido cítrico e L-sorbose (positivos na descrição). A linhagem 85 não divergiu em nenhum teste. A linhagem 491 apresentou resposta fraca aos testes de assimilação para D-xilose, ácido succínico, melibiose e dulcitol (todos positivos na descrição). Estas linhagens identificadas apresentaram Q-9 em maior porcentagem, de acordo com KREGER VAN RIJ (1984). Foi confirmada a classificação para as linhagens com a descrição sugerida por SUZUKI et al., 1987 b, divergindo nos testes de D-ribose L-ramnose (ambos positivos na descrição). Esta espécie foi estudada em trabalhos envolvendo ambientes aquáticos não poluídos de baía e sedimentos (KREGER VAN RIJ, 1984), e poluídos da região da Grande São Paulo

(APOLINÁRIO & MARTINEZ, 1985a), água marinha na praia de Boa Viagem - Recife (QUEIROZ, 1972; QUEIROZ & MACÊDO, 1972). Esta espécie faz parte da flora de leveduras marítimas facultativas e foram encontradas associadas a algas e animais (*Mytilus adulis*, *Crassostrea*, *Virginica*, *Marcenaria mescenaria*, *Penaeus setiferus*) (RHEINHEIMER, 1979), em frutos imaturos de *Guateria hilariana* na Estação Ecológica de Jureia-Itatins (PRADA, 1994), em frutas tropicais (RALE & VAKIL, 1984; YOSHIDA et al., 1991; TOKUOKA & ISITANI, 1991), frutas cítricas (SPENCER et al., 1992), em amostras de solo, ar, flores e insetos (BARNETT et al., 1990).

Candida quercitrusa: as linhagens 41, 48, 294 foram identificadas como *Candida quercitrusa*. A linhagem 41 apresentou resposta fraca em crescimento em meio isento de vitaminas (negativo na descrição). A linhagem 48 fermentou ligeiramente a galactose (resposta negativa na descrição) e não assimilou D-xilose (resposta positiva). A linhagem 294 fermentou sacarose (negativo na descrição) e apresentou resposta fraca na assimilação de D-xilose (positivo na descrição), divergiu na habilidade em hidrolizar arbutina e crescer em meio isento de vitaminas (negativos na descrição). As linhagens identificadas possuem a coenzima Q-9 em maior porcentagem. A *Candida quercitrusa* foi estudada em trabalhos anteriores associada a insetos e folhas de carvalho (KREGER VAN RIJ, 1984; BARNET, 1983). A ocorrência desta levedura em ambiente aquático não se encontra descrita na literatura consultadas. A sua presença neste estudo está possivelmente associado à existência de vetores (insetos, ar, e outros) que carregam microrganismos através do ambiente.

Candida valida: as linhagens 84, 486 e 501 foram identificadas como *Candida valida*. De acordo com a literatura, as três linhagens confirmaram com totalidade os testes bioquímicos. As três linhagens apresentaram Q-7 em maior porcentagem, conferindo com estudo realizado para esta espécie (VILJOEN & KOCK, 1989). Pela descrição sugerida (SUZUKI et al., 1987 b) as linhagens divergiram nos testes de assimilação do ácido succínico e etanol e a resistência a

cicloheximida 100 e 1000 ppm (positivos na descrição) mas conferiram com a descrição proposta por APOLINÁRIO & MILANEZ (1985a). A presença desta espécie (estado perfeito: *Pichia membranofaciens*) foi estudada em frutos maduros de *Eugenia sp*, *Guateria sp B*, *Pourourama guinensens* e *Garcinia gardneriana* na Estação Ecológica de Juréia-Itatins (PRADA, 1994), na água acumulada em bromélias, flores de *Ipanema pes-caprae* e cacto *Cereus perambucensis* (ROSA, 1993). Foi isolado em corpos d' água na região da Grande São Paulo (APOLINÁRIO & MARTINEZ, 1985a) e em moluscos na Tailândia (SUZUKI et al., 1987b).

***Candida bombi*:** as linhagens 25 e 27 foram identificadas como *Candida bombi*. O resultado de Coenzima foi Q-9. A linhagem 27 apresentou resposta fraca na assimilação do teste para L-ramnose e melezitose (ambas as respostas negativas na descrição). A linhagem 25 não diferiu em nenhum teste quando comparada com a descrição. Esta espécie foi estudada em abelhas (KREGER VAN RIJ, 1984), e em flores (TOKUOKA & ISHITANI, 1991), a ocorrência desta levedura em ambiente aquático não se encontra descrita nas literaturas consultadas.

***Candida nitrativorans*:** a espécie *Candida nitrativorans* foi representada pelas linhagens 37 e 243. A linhagem 243 apresentou um crescimento fraco aos testes de assimilação para galactose, celobiose, trealose e ácido cítrico (positivos na descrição). As linhagens identificadas possuem a coenzima Q-9 em maior porcentagem. Não foi citado a ocorrência desta levedura em ambientes aquáticos nas literaturas consultadas.

***Candida torresii*:** *Candida torresii* foi representada pelas linhagens 44 e 86. A linhagem 44 divergiu da descrição na fermentação da galactose e na assimilação da melibiose e melezitose (negativos na descrição), apresentando resposta fraca na assimilação da salicina (positivo na descrição). A linhagem 86 fermentou fracamente a sacarose (negativo na descrição), assimilou a melezitose (negativo na descrição) e apresentou resposta fraca na assimilação da L-sorbose (positivo na descrição).

Ambas as culturas apresentaram Q-9 em maior porcentagem, conferindo com os dados apresentados por VILJOEN & KOCK, 1989. Esta espécie foi estudada em água do mar (KREGER VAN RIJ (1984) e em rios de locais poluídos na região de São Paulo (PEÇANHA, 1991; APOLINÁRIO, 1984).

Candida citrea: as linhagens 80 e 82 foram identificadas como *Candida citrea*. A linhagem 80 divergiu da descrição no teste de hidrólise da arbutina (negativo na descrição) e a linhagem 82 confirmou os testes bioquímicos com a descrição. Ambas as culturas possuem coenzima Q-7 em maior porcentagem. Esta espécie não foi descrita em ambientes aquáticos nas literaturas consultadas; mas em fruto de limão e banana por KREGER VAN RIJ (1984).

Candida versatilis: as linhagens 34 e 288 foram identificadas como *Candida versatilis*. A linhagem 34 apresentou resposta fraca na fermentação da maltose, trealose e glicerol, não cresceu em meio básico livre de vitaminas (positivos na descrição). A linhagem 288 apresentou resposta fraca à trealose (positivo na descrição). No teste de quinonas ambas as culturas possuem Q-9 em maior porcentagem. Foi associada em estudos anteriores com a microbiota da água acumulada em bromélias, nas flores *Ipomea pescaprae* e do cacto *Cereus pseumbucansis* por ROSA (1993). Foi isolada em frutos maduros de *Eugenia sp.*, *Guateria sp B*, *Pououma guianensis* e *Garcinia gardneriana* na Estação Ecológica de Juréia-Itatins (PRADA, 1994), na fruta de kiwi e soja (TOKUOKA & ISHITANI, 1991; SUZUKI et al., 1992).

Candida boidini: as linhagens 496 e 498 foram identificadas como *Candida boidini*. A linhagem 496 obteve resposta positiva na assimilação do ácido succínico (negativo na descrição). A linhagem 498 divergiu na assimilação do ácido succínico (negativo na descrição) e obteve resposta fraca na assimilação da maltose e trealose (negativos na descrição). Ambas apresentaram Q-7 em maior porcentagem. A ocorrência desta espécie foi estudada em ambientes aquáticos (mar) (KREGER VAN RIJ, 1984; KOHLMAYER & KOHLMAYER, 1979), a solo, água

do mar (BARNETT et al., 1990), em frutos maduros e imaturos de frutas de gêneros *Guateria*, *Guateria hilariana* e *guateria spp* na Estação Ecológica de Juréia-Itatins (PRADA; 1994).

***Candida parapsilosis*:** a linhagem 245 foi identificada como *Candida parapsilosis*, divergindo apenas no teste de assimilação de melezitose, obtendo uma resposta positiva (negativo na descrição). Esta linhagem apresentou a coenzima Q-9. Conferindo a identificação com a descrição proposta por APOLINÁRIO & MILANEZ (1985a), exceto para a fermentação da galactose, apresentou resposta positiva (negativa na descrição). Esta espécie foi descrita em ambientes aquáticos (BARNETT et al., 1990; KREGER VAN RIJ, 1984; MEYERS et al., 1970), em corpos da água na região da Grande São Paulo (APOLINÁRIO & MILANEZ, 1985), associada água e alga marinha (*F. vesiculosus*) na praia de Boa Viagem - Recife (QUEIROZ, 1972 e QUEIROZ & MACÊDO, 1972), em concha do mar (SUZUKI et al., 1987), em rios pouco e moderadamente poluídos (PEÇANHA, 1991; SILVA FILHO, 1988), associada ao camarão *Penaeus setiferus* na costa do costa do Mexico, no Golfo do Mexico (PHAFF et al., 1952) e origem marinha causada por contaminação fecal (PIANTELLI et al., 1984). Sua presença foi associada a algas e animais marítimos (*Mytilus edulis*; *Octopus vulgaris*; *Crassostrea virginica*, *Penaeus setiferus* e outros), na areia de praia, e água do mar no Golfo do Mexico, Oceanos Atlântico, Pacífico e Índico (KOHLMAYER & KOHLMAYER, 1979), em fruta tropical (RALE & VAKIL, 1984, YOSHIDA et al., 1991), associada ao homem e em outros mamíferos (HAGLER & AHERAN, 1987).

***Candida sonkii*:** a linhagem 246 foi identificada como *Candida sonkii*, apresentando resposta fraca para os testes de assimilação de D- manitol, ácido succínico, glicerol e dulcitol (positivos na descrição). Provavelmente esta cultura possui característica anamorfo de basidiomiceto por obter resultado positivo para DBB e urease. Foi confirmada a classificação com a descrição proposta por BELIN

(1981), divergindo nos testes de produção de arbutina e na assimilação do dulcitol. Sua presença foi descrita em lagos (KREGER VAN RIJ, 1984).

Candida bacarum: a linhagem 248 foi identificada como *Candida bacarum*, assimilando a melibiose (negativo na descrição), apresentando resposta fraca na assimilação do amido, D-ribose, ácido succínico, ácido cítrico, salicina e ácido láctico (positivos na descrição). A ocorrência desta levedura em ambiente aquático não se encontra descrita nas literaturas consultadas. Foi descrita em fruta de groselheira preta por KREGER VAN RIJ (1984). Provavelmente esteja associada a ambientes aquáticos via vetores.

Candida fructus: a linhagem 287 foi identificada como *Candida fructus*. Esta linhagem fermentou ligeiramente a sacarose e a maltose (respostas negativas na descrição). Esta espécie foi descrita em fruto de banana (coletado em mercado de alimentos no Japão) por KREGER VAN RIJ (1984). A ocorrência desta levedura em ambiente aquático não se encontra descrita nas literaturas consultadas.

Candida tannotolerans: a linhagem 290 foi identificada como *Candida tannotolerans*, divergindo no crescimento em meio contendo 50% de glicose, na assimilação da lactose e rafinose (negativa para os testes na descrição padrão). Não foi encontrado nas literaturas consultadas descrições desta espécie em ambientes aquáticos.

Candida atmosphaerica: a cultura 453 foi identificada como *Candida atmosphaerica*, apresentando na fermentação da galactose resposta fraca (negativa na descrição). Esta espécie de levedura foi descrita em ambiente aquático na própria água do mar (KOHLMEYER e KOHLMEYER, 1979), no solo e água do mar (BARNETT et al., 1983). Foi isolada em frutos maduros e imaturos dos gêneros *Guateria*, *Guateria hilariana* e *Guateria spp* na Estação Ecológica de Juréia-Itatins (PRADA, 1994) e em ar (MONTRACHER et al., 1990).

Candida friedrichii: a linhagem 454 foi identificada como *Candida friedrichii*, apresentando resposta fraca na assimilação da melibiose (positivo na descrição). Não havendo registros anteriores em estudos de sua ocorrência em ambiente aquático nas literaturas consultadas. Pelo fato desta espécie se adaptar em alimentos com alta concentração salina (KREGER VAN RIJ, 1984) provavelmente ela consegue adaptar-se em ambiente marinho.

Candida pseudointermedia: a linhagem 83 foi identificada como *Candida pseudointermedia*, confirmando com totalidade os testes da descrição padrão. Esta linhagem apresentou Q-9 em maior porcentagem. Esta linhagem foi descrita na pasta de peixe (kamaboko) no Japão (KREGER VAN RIJ, 1984).

Candida solani: a linhagem 503 foi identificada como *Candida solani*, divergindo na assimilação do ácido cítrico (negativo na descrição) e na hidrólise da arbutina (positivo na descrição). Na análise de quinonas apresentou Q-7 em maior porcentagem. Esta espécie foi descrita em corpos d'água na região da Grande São Paulo (APOLINÁRIO, 1986b).

Candida sp: as linhagens 355 e 295 diferiram da descrição padrão em testes importantes, não sendo possível classifica-las em nível de espécie. A *Candida sp B* (295) aproximou-se muito na descrição feita por SUZUKI et al., 1991, com a *Candida fragi*, mas divergiu na análise de quinonas.

Provavelmente a linhagem 37 (*Candida tannotolerans*) seja uma variedade diferente pois ela divergiu em vários testes. É possível que as culturas que divergem da descrição padrão da espécie neste trabalho e que foram isoladas em pontos distintos da água do Rio Una do Prelado, possam representar novos biotipos ou até variedades diferentes entre grupos da mesma espécie.

4.3.2 - Leveduras pigmentadas.

Encontram-se agrupadas nesta categoria as leveduras *Rhodotorula* e *Sporobolomyces* apresentando pigmentação carotenóide.

***Rhodotorula aurantiaca*:** as linhagens 40, 129, 241 e 242 foram identificadas como *Rhodotorula aurantiaca*. As linhagens 129, 40 e 241 obtiveram correspondência com a descrição. A linhagem 242 cresceu em meio contendo 50 % de glicose (negativo na descrição). As linhagens 40 e 242 não assimilaram celobiose e L - arabinose, não prejudicando na identificação. Esta espécie foi estudada em estuários (BARNET et al., 1983), em ambientes aquáticos (Oceano), solo, planta (KREGER VAN RIJ, 1984; KOHLMAYER, 1979; FELL & NEWELL, 1970; HAGLER & AHERAN, 1978).

***Rhodotorula mucilaginosa*:** as linhagens 28 e 30 foram identificadas como *Rhodotorula mucilaginosa* variedade *mucilaginosa* (*R. rubra*) , a linhagem 28 tem uma resposta fraca no crescimento em meio básico sem vitaminas e não produz ácido, divergindo da linhagem 30. Foi associada em trabalhos anteriores a ambientes aquáticos (água doce, mar), associando-se a algas (*Fucus vesiculosus*, *thalossiora subtilis*), solo, ar e outros mamíferos (GOTO et al., 1974b; YAMASATO et al., 1974; KOHLMAYER & KOHLMAYER, 1979; MEYERS et al., 1970; VAN UDEN & FELL, 1968, PIANTELLI et al., 1984, BARNETT, 1990). No rio contaminado por esgotos doméstico (PEÇANHA, 1993). Associada ao estudo do camarão (*Penaeus schmitti*) por PHAFF et al., 1952 e PAGNOCCA et al. (1989) no Rio de Janeiro. Sua presença foi associada ao fruto de abacaxi (*Ananas comusus*), num estudo feito com o solo, flor, fruto maduro e o próprio ar, na Fazenda Progresso no município de São Vicente de Paula, na cidade de Aruarama, Estado do Rio de Janeiro (ROBBS et al., 1989). A *Rhodotorula rubra* de origem aquática possui um sinônimo: *Rhodotorula mucilaginosa* (FELL & KURTZMAN, 1990). Foi associada à fruta tropical e alimentos de alta concentração de açúcar (TOKUOKA et

al., 1985; TOKUOKA & ISHITANI, 1991; YOSHIDA et al., 1991; RALE & VAKIL, 1984).

Rhodotorula glutins: as linhagens 293 e 296 foram identificadas como *Rhodotorula glutins*. A linhagem 293, cresceu em meio básico com 50% de glicose, diferindo na descrição padrão. A segunda cresceu em 37°C, assimilou lactose, e obteve resposta fraca na assimilação da galactose (diferindo da descrição padrão). Esta espécie foi estudada em ambientes aquáticos por KOHLMAYER & KOHLMAYER (1979) e GOTO et al. (1974a). Foi isolada em plantas, folhas, ar, solo, água fresca, água do mar (KREGER VAN RIJ, 1984; BARNET, 1983; VAN UDEN & FELL, 1968; NEWELL & FELL, 1970; GOTO et al., 1974; PIANTELLI et al., 1984) e associada a algas marítimas e animais (caranguejo: *Uca pugilator*; camarão *Penaeus setiferus* e *Peneaus setiferus* (PHAFF et al., 1952; KOHLMAYER & KOHLMAYER, 1979). Na região da Grande São Paulo, num estudo realizado com redes de tratamento de água (APOLINARIO & MILANEZ, 1986a) foi encontrada esta espécie. Na bacia do Rio de Janeiro, foi feito um estudo associando esta levedura com o camarão *Penaeus schmitti* (PAGNOCCA et al., 1989). Associado à flor (TOKUOKA & ISHITANI, 1991), à fruta tropical (RALE & VAKIL, 1984) e abacaxi (ROBBS et al., 1989).

Rhodotorula graminis: a linhagem 88 foi identificada como *Rhodotorula graminis*, conferindo com totalidade a descrição na literatura. Esta espécie foi descrita na literatura em estudos feitos em águas marinhas (Oceano Pacífico, Índico e Atlântico) (KREGER VAN RIJ, 1984), mas não se adaptando em águas doce (APOLINÁRIO, 1986a), associada à algas (*Chlorophyta*, *Phaeophyta*) e sedimentos de água do mar (KOHLMAYER & KOHLMAYER, 1979).

Sporobolomyces roseus: as linhagens 33, 89 e 289 foram identificadas como *Sporobolomyces roseus*. A linhagem 33 obteve resposta fraca na assimilação da rafinose (positiva na descrição). Alinhagem 89 obteve resposta fraca na assimilação da maltose e amido. A linhagem 289 obteve resposta fraca no teste de

nitrito de potássio (positivo na descrição). As três linhagens produziram balistosporos. Esta espécie foi descrita na literatura em ambiente aquático (água doce), ar, solo, plantas, insetos, pelos autores KREGER VAN RIJ (1984), BARNET (1983), KOHLMAYER & KOHLMAYER (1979), HAGLER & AHERAN (1987) e BARNETT et al. (1990).

4.3.3 - Gêneros com características ascomicéticas.

Foram detectados 4 gêneros de leveduras com frequência muito baixa:

Zygosaccharomyces microellipsoides: a linhagem 493 foi identificada como *Zygosaccharomyces microellipsoides*. Esta linhagem esporulou em meio "YM ágar" de acordo com KREGER VAN RIJ 1984. Apresentou resposta positiva na assimilação da maltose, trealose e eritritol (negativos na descrição). Esta espécie foi estudada no transpiro de árvores (KREGER VAN RIJ, 1984). A ocorrência desta levedura em ambiente aquático não foi descrita nas literaturas consultadas.

Saccharomyces exiguus: a linhagem 499 foi identificada como *Saccharomyces exiguus*. Todos os testes bioquímicos foram iguais de acordo com a descrição, exceto para o teste de osmotolerância em meio contendo 50% de glicose (negativo na descrição). Esta espécie foi descrita em solo (KREGER VAN RIJ, 1984; BARNET, 1983), em Oceanos e em rios de água doce (KOHLMAYER & KOHLMAYER, 1979).

Williopsis saturnus: As linhagens 35 e 497 foram identificadas como *Williopsis saturnus* (*Hansenula saturn* variedade *saturn*). A linhagem 35 não assimilou salicina (positivo na descrição), obteve resposta fraca na assimilação da galactose e maltose. A linhagem 497 não divergiu em nenhum teste quando comparado com a descrição padrão. A linhagem ascomicética, denominada *Williopsis saturnus* (*Hansenula saturnus* variedade *saturnus*) foi descrita em solo na América do Norte e em água doce (KREGER VAN RIJ, 1984; RHEINHEIMER,

1979), na microbiota da maçã (DAVENPORT, 1980), em corpos d'água na região da Grande São Paulo (APOLINÁRIO & MARTINEZ, 1985a).

Kluyveromyces aestuarii: as linhagens 286 e 492 foram identificadas como *Kluyveromyces aestuarii*. A linhagem 286 apresentou resposta fraca na assimilação de ribitol e d-manitol (positivos na descrição). Esta espécie foi descrita em estuário da Baía Biscoyne (KREGER VAN RIJ, 1984), em estuário, fazendo parte do grupo de leveduras marítimas obrigatórias (KOHLMEYER & KOHLMEYER, 1979).

4.3.4 - Demais gêneros classificados em nível de espécie.

Cryptococcus macerans e *Cryptococcus luteolus*: a linhagem 249 foi identificada como *Cryptococcus macerans*, divergindo na reação de iodo (positiva na descrição). A linhagem 318 foi identificada como *Cryptococcus luteolus*, obtendo resposta fraca na assimilação do d-manitol, ácido cítrico (positivos na descrição). A linhagem 318 divergiu nos testes de assimilação da trealose, eritritol e melibiose (todos negativo na descrição) ao comparar a chave de identificação proposta por APOLINÁRIO & MILANEZ (1986a). Estas duas espécies foram descritas em ambientes aquáticos no Oceano Atlântico, Índico e Pacífico (KOHLMEYER & KOHLMEYER, 1979; MEYERS et al., 1970 e YAMASATO et al., 1970; FELL & VAN UDEN, 1963). A espécie *Cryptococcus macerans* foi isolada em flores (HAGLER & AHERAN, 1987; BARNETT et al., 1983). A linhagem de *Cryptococcus luteolus* foi associada ao ar, folha (KREGER VAN RIJ, 1984) e no fruto maduro e imaturo de abacaxi (*Ananas comosus*) (ROBBS et al., 1989). Ambas as culturas foram descritas em corpos d' água na região da Grande São Paulo (APOLINÁRIO & MILANEZ, 1986a) e em águas limpas por PIANTELLI et al. (1984).

Trichosporon asahii: a linhagem 21 foi identificada como *Trichosporon asahii* (*T. figueirae*) diferindo apenas no crescimento em meio isento de vitaminas (negativo na descrição). Houve descrição de *Trichosporon spp.* no intestino de camarão (*Penaeus schmitti*) e em águas na baía do Rio de Janeiro (PAGNOCCA et

al., 1989), em água doce (APLINÁRIO & MILANEZ, 1986b), em fezes humanas (KREGER VAN RIJ, 1984). Este gênero é caracterizado pela sua pobre adaptação à salinidade e a exposição ao sol de acordo com PIANTELLI et al. (1984), este gênero foi coletado num ambiente de salinidade zero.

Fellomyces fuzhouensis: *Fellomyces fuzhouensis* obteve um único representante, a linhagem 292, divergindo na reação de iodo, obtendo resultado negativo (positivo na descrição), e obtendo resposta fraca na assimilação do eritritol, ácido succínico e ácido cítrico (todos positivos na descrição). Esta cultura produziu micélio verdadeiro. Esta espécie foi associada ao golfinho por KREGER VAN RIJ (1984) e no próprio Oceano Atlântico por KOHLMAYER (1979).

Aureobasidium pullulans: as linhagens 495 e 500 foram identificadas como *Aureobasidium pullulans*, com células predominantemente cilíndrica, ocasionalmente ovóide, apresentando pseudomicélio e micélio verdadeiro, ascosporos não são formados e habilidade fermentativa ausente em ambas as culturas. Provavelmente a linhagem 495 pode ser identificada como *Aureobasidium pullulans* variedade *pullulans* por ser cultura de aspecto leveduriformes, de cor rosado- amarelado ou marrom claro no final de um mês, a cultura 500 pode ser *A. pullulans* variedade *melanigenum* por apresentar aspecto filamentoso, de cor preta a marrom escura após um mês de cultivo de acordo com o autor APOLINÁRIO & MILANEZ (1986b). Esta espécie foi estudada num trabalho de isolamento de leveduras de água na rede de tratamento da região da Grande São Paulo (APOLINÁRIO & MARTINEZ (1986). Foi isolado em animais aquáticos (espécie de molusco; camarão: *Penaeus setiferus*; peixe: *Haemulon aureolineotum*, *Lactophrys quadricornuta*; salmão) (KOHLMAYER, 1979), isolada na lagoa de Champlain (USA) (MEYERS et al., 1970), e em solos (DOMSCH et al., 1993).

4.4 - Considerações finais.

Uma grande diversidade de espécies de leveduras foram encontradas nas amostras de água do Rio Una do Prelado, coletados da região de água doce até o estuário.

Das 68 espécies identificadas até espécie, apenas 7 confirmaram totalmente as descrições das cultura tipo. Este resultado era esperado pois quase a totalidade das culturas tipo são de originais do hemisfério norte (Europa, EUA, Japão, etc.) diferindo enormemente com as condições tropicais dos ambientes brasileiros do presente estudo. A ocorrência de variações fenotípicas foi esperada ao estudar ambientes distintos daqueles dos quais vieram as culturas "tipo", utilizadas para descreverem a espécie na literatura. Este fato tem ocorrido com frequência na identificação de espécies em locais tropicais e subtropicais, pois a maioria das culturas - tipo é proveniente de clima temperados. Em trabalhos realizados por SILVA FILHO, 1988; PAULA et al., 1983; ROSA et al., 1993; PRADA, 1994; e outros, estudando isolados de fontes tropicais citam que mais de 80% das linhagens apresentaram discrepâncias em relação á descrição proposta por Kreger Van Rij (1984).

A presença de vetores que conduziram as leveduras para ambientes aquáticos foi demonstrada pelo número de leveduras isoladas em ambientes aquáticos, mas que provavelmente não fazem parte da microflora aquática, como por exemplo a *Candida bombi*, associada a abelhas, *Candida quercitrusa* a insetos e flores, *Candida bacarum* a frutas e a *Candida tannotolerans* ao licor de tanino. O carregamento de microrganismos ocorre via vetores para o rio através da ação de chuvas, insetos, ventos ou fontes diversas. Cada levedura possui características particulares de adaptação em ambientes aquáticos, uma vez que a mudança de ambiente acarreta modificação no comportamento de cada microrganismo em relação a sua própria sobrevivência e sua multiplicação. Fatores como profundidade, temperatura, fonte de energia utilizável (algas), pH, salinidade e outros, são muito

importante para o crescimento e proliferação dos microrganismo. As transferências do ambiente terrestre para o ambiente marinho, e deste para o meio de cultura pode acarretar diferenciações no desenvolvimento funcional e estrutural dos microrganismo, bem como a difícil adaptação e isolamento in vitro, acarretando provavelmente em uma nova espécie (QUEIROZ, 1972; QUEIROZ & MACÊDO, 1972; KOHLMAYER & KOHLMAYER, 1979; PIANTELLI et al., 1984; HAGLER & MENDONÇA - HAGLER, 1991).

Provavelmente a diversidade aumentou na segunda coleta com o aumento das chuvas de verão, permitindo uma diversidade maior devido ao aumento de nutrientes carreados para o rio; com o aumento das chuvas foi possível verificar um ligeiro decréscimo no pH. Outro dado interessante foi que a própria salinidade diminuiu no verão, provavelmente a própria chuva diminuiu a concentração de sal do rio, ou pelo acréscimo de nutrientes orgânicos carreados pela chuva.

Considerando todos os dados físico-químicos contidos na TABELA 3 (pH, temperatura, profundidade e largura da coleta, porcentagem da salinidade, fósforo e nitrogênio da água do rio) nos três pontos de coleta pôde-se observar um acréscimo na diversidade microbiana na segunda coleta. Provavelmente o que contribuiu para o acréscimo da diversidade microbiana de leveduras possa ter sido todos os fatores juntos ou apenas alguns. Neste caso, pode-se sugerir para um futuro trabalho o estudo mais aprofundado de quais são os fatores que influenciam o crescimento microbiológico de leveduras aquáticas, qual a relação de crescimento das leveduras com o acréscimo da concentração de nitrogênio no meio de crescimento, qual a relação existente entre a concentração de fósforo, crescimento microbiano e ainda analisar se existem fatores físico-químicos que poderiam inibir ou incentivar o crescimento de um determinado grupo de leveduras.

Provavelmente o aumento do índice pluviométrico dois dias antes da segunda coleta contribuíram para um aumento da diversidade microbiana e também para os valores físico-químicos da segunda coleta.

TABELA 6- Espécies de leveduras isoladas nos três pontos de coleta.

Local de coleta	isolado	espécie isolada	isolado	espécie isolada
	n ^o		n ^o	
Rio	21	<i>Trichosporon asahii</i>	249	<i>Cryptococcus macerans</i>
	25	<i>Candida bombi</i>	285	<i>Candida pintolopesii</i> var. <i>pintolopesii</i>
	26	<i>Candida sake</i>	289	<i>Sporobolomyces roseus</i>
	27	<i>Candida bombi</i>	293	<i>Rhodotorula glutinis</i>
	28	<i>Rhodotorula mucilaginosa (rubra)</i>	294	<i>Candida quercitrusa</i>
	30	<i>Rhodotorula mucilaginosa (rubra)</i>	295	<i>Candida sp.</i>
	31	<i>Candida famata</i>	296	<i>Rhodotorula glutinis</i>
	48	<i>Candida quercitrusa</i>	318	<i>Cryptococcus luteolus</i>
	89	<i>Sporobolomyces roseus</i>	355	<i>Candida sp.</i>
	90	<i>Candida sake</i>	356	<i>Candida pintolopesii</i> var. <i>pintolopesii</i>
	129	<i>Rhodotorula aurantiaca</i>	499	<i>Saccharomyces exiguus</i>
	248	<i>Candida bacarum</i>	502	<i>Candida pintolopesii</i> var. <i>pintolopesii</i>
Mangue	32	<i>Candida sake</i>	245	<i>Candida parapsilosis</i>
	33	<i>Sporobolomyces roseus</i>	246	<i>Candida sonkii</i>
	34	<i>Candida versatilis</i>	290	<i>Candida tannotolerans</i>
	35	<i>Williopsis saturnus</i>	291	<i>Candida pintolopesii</i> var. <i>pintolopesii</i>
	36	<i>Candida pintolopesii</i> var. <i>pintolopesii</i>	292	<i>Fellomyces fuzhouensis</i>
	37	<i>Candida nitrativorans</i>	486	<i>Candida valida</i>
	38	<i>Candida famata</i>	491	<i>Candida guilliermondii</i>
	43	<i>Candida famata</i>	492	<i>Kluyveromyces aestuarii</i>
	44	<i>Candida torresii</i>	493	<i>Zygosaccharomyces microellipsoides</i>
	243	<i>Candida nitrativorans</i>	500	<i>Aureobasidium pullulans</i>
	244	<i>Candida sake</i>	501	<i>Candida valida</i>
Estuário	39	<i>Candida famata</i>	241	<i>Rhodotorula aurantiaca</i>
	40	<i>Rhodotorula aurantiaca</i>	242	<i>Rhodotorula aurantiaca</i>
	41	<i>Candida quercitrusa</i>	286	<i>Kluyveromyces aestuarii</i>
	42	<i>Candida guilliermondii</i>	287	<i>Candida fructus</i>
	80	<i>Candida citrea</i>	288	<i>Candida versatilis</i>
	82	<i>Candida citrea</i>	453	<i>Candida atmosphaerica</i>
	83	<i>Candida pseudointermedia</i>	454	<i>Candida friedrichii</i>
	84	<i>Candida valida</i>	495	<i>Aureobasidium pullulans</i>
	85	<i>Candida guilliermondii</i>	496	<i>Candida boidini</i>
	86	<i>Candida torresii</i>	497	<i>Williopsis saturnus</i>
	87	<i>Candida sake</i>	498	<i>Candida boidini</i>
	88	<i>Rhodotorula graminis</i>	503	<i>Candida solani</i>

TABELA 7: Resultados dos exames morfológicos, fisiológicos e bioquímicos das leveduras isoladas.

Prova/cultura	<i>Trichosporon asahii</i>	<i>Rhodotorula aurantiaca</i>			
	21	40	129	241	242
pigmento	<i>b</i>	v	v	v	v
Pseudomicélio	+/ <i>a</i>	-	-	-	-
Ascosporos	-	-	-	-	-
Brotamento	<i>bm</i>	bm	<i>bm</i>	<i>bm</i>	<i>bm</i>
F. Glicose	-	-	-	-	-
F. Galactose	-	-	-	-	-
F. Sacarose	-	-	-	-	-
F. Maltose	-	-	-	-	-
F. Lactose	-	-	-	-	-
F. Rafinose	-	-	-	-	-
Glicose	-	+	+	+	+
Galactose	+	+	<i>F</i>	<i>F</i>	+
Sacarose	-	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+
Celobiose	+	-	<i>F</i>	+	-
Trealose	+	+	+	+	<i>F</i>
Lactose	+	-	-	-	-
Rafinose	-	-	-	-	-
Amido	-	-	-	-	-
D-Xilose	+	<i>F</i>	+	<i>F</i>	<i>F</i>
L-Arabinose	+	-	+	+	-
D-Arabinose	+	<i>F</i>	+	+	-
D-Ribose	+	-	-	-	-
L-Ramnose	+	-	-	-	-
Eritritol	+	-	-	-	-
Ribitol	<i>F</i>	+	+	+	+
D-Manitol	-	+	+	+	+
Ac. succínico	<i>F</i>	+	<i>F</i>	<i>F</i>	+
Ac. Cítrico	<i>F</i>	<i>F</i>	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-
L-Sorbose	+	-	-	+	-
Melibiose	-	-	-	-	-
Melezitose	-	+	+	+	+
Inulina	-	-	-	-	-
Etanol	-	-	-	-	-
Glicerol	+	+	+	-	-
Dulcitol	-	-	-	-	-
Glucitol	-	<i>F</i>	+	+	-
Salicina	-	-	-	-	-
Ac. Láctico	+	-	-	-	-
Metanol	-	-	-	-	-
Cicloheximida 100	-	-	-	-	-
Cicloheximida 1000	-	-	-	-	-
NaCl 10%	+	-	-	+	-
KNO ₃	-	+	+	+	+
NaNO ₂	+	+	+	+	+
Lisina	+	-	-	-	-
Etilamina	-	-	-	-	-
VFB	+	-	-	-	-
37°C	+	-	+	+	-
DBB	+	+	+	+	+
Urease	+	+	+	+	+
Arbutina	<i>F</i>	-	<i>F</i>	+	+
Reação de Iodo	+	-	-	-	-
Prod Ácido	-	-	-	-	+
50% de Glicose	+	+	-	-	<i>F</i>
Balistosporos	-	-	-	-	-

Para a apresentação dos resultados referentes à identificação das leveduras foram utilizadas as seguintes anotações: (+) resposta positiva à prova; (-) resposta negativa à prova; (a) presença de artrosporos; (f) resposta fraca à prova; (nd) resultado não determinado, (b) colônia branca; (c) colônia creme; (r) colônia rosa; (v) colônia vermelha; (p) colônia preta; (m) colônia marrom; (bb) brotamento bipolar; (bm) brotamento multipolar; (sf) esporos esféricos; (st) esporos na forma de saturno.

TABELA 7: (continuação).

Prova/cultura	<i>Rhodotorula glutinis</i>		<i>Rhodotorula rubra</i>		<i>Rhodotorula graminis</i>
	293	296	28	30	88
pigmento	v	v	v	v	v
Pseudomicélio	-	-	-	-	-
Ascosporos	-	-	-	-	-
Brotamento	bm	bm	bm	bm	bm
F. Glicose	-	-	-	-	-
F. Galactose	-	-	-	-	-
F. Sacarose	-	-	-	-	-
F. Maltose	-	-	-	-	-
F. Lactose	-	-	-	-	-
F. Rafinose	-	-	-	-	-
Glicose	+	+	+	+	+
Galactose	+	F	-	-	+
Sacarose	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	-	-	-
Celobiose	+	+	-	-	-
Trealose	+	+	+	+	+
Lactose	-	+	-	-	-
Rafinose	+	+	+	+	+
Amido	F	-	-	-	-
D-Xilose	+	+	-	-	+
L-Arabinose	+	+	-	-	-
D-Arabinose	+	+	+	+	+
D-Ribose	+	-	+	+	F
L-Ramnose	-	F	-	-	F
Eritritol	-	-	-	-	-
Ribitol	+	+	F	F	+
D-Manitol	+	+	-	-	+
Ac. succínico	+	F	F	+	+
Ac. Cítrico	+	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-
L-Sorbose	-	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-	-
Melezitose	+	+	-	-	-
Inulina	-	-	-	-	-
Etanol	+	-	-	-	-
Glicerol	+	-	-	-	+
Dulcitol	+	-	-	-	-
Glucitol	+	F	-	-	-
Salicina	-	-	-	-	-
Ac. Láctico	-	-	-	-	-
Metanol	-	-	-	-	-
Cicloheximida 100	-	-	-	-	-
Cicloheximida 1000	-	-	-	-	-
NaCl 10%	-	-	-	-	-
KNO ₃	+	+	-	-	+
NaNO ₂	+	-	-	-	+
Lisina	+	-	-	-	F
Etilamina	F	-	-	-	F
VFB	F	F	F	-	F
37°C	-	+	-	-	-
DBB	+	+	-	-	+
Urease	+	+	+	+	+
Arbutina	+	+	-	-	+
Reação de Iodo	-	-	-	-	-
Prod Ácido	+	+	-	+	-
50% de Glicose	+	-	+	+	+
Balistosporos	-	-	-	-	-

TABELA 7: (continuação).

Prova/cultura	<i>Sporobolomyces roseus</i>			<i>Cryptococcus macerans</i>	<i>Cryptococcus luteolus</i>
	33	89	289	249	318
pigmento	vs	v	v	c	c
Pseudomicélio	-	-	-	F	-
Ascosporos	-	-	-	-	-
Brotamento	bm	bm	bm	bm	bm
F. Glicose	-	-	-	-	-
F. Galactose	-	-	-	-	-
F. Sacarose	-	-	-	-	-
F. Maltose	-	-	-	-	-
F. Lactose	-	-	-	-	-
F. Rafinose	-	-	-	-	-
Glicose	+	+	+	+	+
Galactose	-	+	+	+	+
Sacarose	+	+	F	+	+
Maltose	+	+	F	+	+
Celobiose	-	-	-	+	+
Trealose	+	F	+	+	+
Lactose	-	-	-	+	+
Rafinose	+	+	+	+	+
Amido	+	+	F	+	F
D-Xilose	-	-	-	+	+
L-Arabinose	F	-	-	+	+
D-Arabinose	F	+	F	-	-
D-Ribose	-	-	-	+	-
L-Ramnose	-	-	-	F	F
Eritritol	-	-	-	+	+
Ribitol	+	+	F	F	+
D-Manitol	-	+	+	F	+
Ac. succínico	-	-	+	F	F
Ac. Cítrico	-	-	+	F	F
Inositol	-	-	-	+	+
L-Sorbose	-	+	-	-	-
Melibiose	-	-	-	+	+
Melezitose	+	+	-	+	+
Inulina	-	-	-	-	-
Etanol	-	-	-	F	-
Glicerol	-	-	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	-	-
Glucitol	+	+	+	-	-
Salicina	-	-	-	-	-
Ac. Láctico	-	-	-	-	-
Metanol	-	-	-	-	-
Cicloheximida 100	-	-	-	-	-
Cicloheximida 1000	-	-	-	-	-
NaCl 10%	-	-	-	F	-
KNO ₃	+	+	F	+	-
NaNO ₂	-	+	-	-	-
Lisina	-	-	-	+	+
Etilamina	+	-	F	-	-
VFB	-	-	-	-	-
37°C	-	-	-	-	-
DBB	+	+	+	+	+
Urease	+	+	+	+	+
Arbutina	+	+	+	+	+
Reação de Iodo	-	-	-	-	+
Prod Ácido	+	+	-	+	+
50% de Glicose	+	+	-	+	+
Balistosporos	+	+	+	-	-

TABELA 7:(Continuação).

Prova/cultura	<i>Williopsis saturnus</i>		<i>kluyveromyces aestuarii</i>		<i>Fellomyces fuzhouensis</i>
	35	497	286	492	292
pigmento	b	b	b	b	b
Pseudomicélio	F	+	-	-	+
Ascosporos	+ st	+ st	+ sf	+ sf	-
Brotamento	bm	bm	bm	bm	bm
F. Glicose	+	+	+	+	-
F. Galactose	-	-	-	-	-
F. Sacarose	+	+	+	+	-
F. Maltose	-	-	-	-	-
F. Lactose	-	-	-	-	-
F. Rafinose	F	F	F	F	-
Glicose	+	+	+	+	+
Galactose	F	-	+	+	+
Sacarose	-	+	+	+	+
Maltose	F	-	-	+	-
Celobiose	+	-	+	+	+
Trealose	-	-	-	-	+
Lactose	-	-	+	+	+
Rafinose	-	+	+	+	+
Amido	-	-	-	-	+
D-Xilose	+	+	-	-	+
L-Arabinose	-	-	-	-	F
D-Arabinose	-	-	-	-	F
D-Ribose	-	-	-	-	F
L-Ramnose	-	-	-	-	F
Eritritol	-	-	-	-	F
Ribitol	-	-	-	+	F
D-Manitol	-	-	F	+	+
Ac. succínico	+	+	F	-	F
Ac. Cítrico	-	-	-	-	F
Inositol	-	-	-	-	F
L-Sorbose	-	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-	+
Melezitose	-	-	F	+	+
Inulina	-	-	-	-	-
Etanol	-	-	-	-	-
Glicerol	+	+	F	+	+
Dulcitol	-	-	-	-	-
Glucitol	-	-	-	-	F
Salicina	+	-	-	-	-
Ac. Lático	-	+	-	-	-
Metanol	-	-	-	-	-
Cicloheximida 100	-	-	-	-	-
Cicloheximida 1000	-	-	-	-	-
NaCl 10%	-	-	-	-	-
KNO ₃	+	F	-	-	-
NaNO ₂	+	-	-	-	-
Lisina	-	+	+	+	-
Etilamina	-	-	-	-	-
VFB	+	+	-	-	-
37°C	-	-	-	-	-
DBB	-	-	-	-	+
Urease	-	-	-	-	+
Arbutina	+	+	+	+	-
Reação de Iodo	-	-	-	-	-
Prod Ácido	+	+	+	+	+
50% de Glicose	-	-	+	+	-
Balistosporos	-	-	-	-	-

TABELA 7:(Continuação).

prova/cultura	<i>Zygosaccharomyces microellipsoides</i>	<i>Saccharomyces exiguus</i>	<i>Aureobasidium pullulans</i>		<i>Candida bombi</i>	
	493	499	495	500	25	27
pigmento	b	b	p	p	b	b
Pseudomicélio	-	-	+	+	+	+
Ascosporos	+ sf	+ sf	-	-	-	-
Brotamento	bm	bm	bm	bm/f	bm	bm
F. Glicose	+	+	-	-	+	+
F. Galactose	F	+	-	-	-	F
F. Sacarose	+	+	-	-	+	+
F. Maltose	-	-	-	-	-	F
F. Lactose	-	-	-	-	-	-
F. Rafinose	+	-	-	-	F	F
Glicose	+	+	+	nd	+	+
Galactose	+	+	-	nd	-	-
Sacarose	+	+	+	nd	+	+
Maltose	+	-	+	nd	-	-
Celobiose	F	-	+	nd	-	F
Trealose	+	+	-	nd	+	+
Lactose	-	-	+	nd	-	-
Rafinose	+	+	+	nd	-	-
Amido	-	-	+	nd	-	-
D-Xilose	F	-	+	nd	-	-
L-Arabinose	-	-	+	nd	-	-
D-Arabinose	-	-	+	nd	-	-
D-Ribose	-	-	F	nd	-	-
L-Ramnose	-	-	+	nd	-	F
Eritritol	+	-	+	nd	-	-
Ribitol	F	-	+	nd	-	-
D-Manitol	+	-	+	nd	+	+
Ac. succínico	-	-	F	nd	F	+
Ac. Cítrico	F	-	+	nd	+	F
Inositol	-	-	+	nd	-	-
L-Sorbose	-	-	-	nd	+	+
Melibiose	+	F	+	nd	-	-
Melezitose	+	-	+	nd	-	F
Inulina	-	-	+	nd	-	F
Etanol	-	-	-	nd	-	-
Glicerol	-	-	+	nd	+	+
Dulcitol	+	-	+	nd	-	-
Glucitol	-	-	+	nd	+	+
Salicina	-	-	+	nd	-	-
Ac. Lático	-	-	-	nd	-	-
Metanol	-	-	-	nd	-	-
Cicloheximida 100	-	-	-	nd	-	-
Cicloheximida 1000	-	-	-	nd	-	-
NaCl 10%	+	+	+	nd	+	+
KNO ₃	-	-	+	nd	-	-
NaNO ₂	-	-	+	nd	-	-
Lisina	-	-	+	nd	+	F
Etilamina	F	-	+	nd	-	-
VFB	+	-	+	nd	+	-
37°C	+	-	-	nd	+	+
DBB	-	-	-	-	-	-
Urease	-	-	+	+	-	-
Arbutina	+	-	-	-	F	F
Reação de Iodo	-	-	-	nd	-	-
Prod Ácido	+	+	+	+	+	+
50% de Glicose	+	+	+	+	+	+
Balistosporos	-	-	-	-	-	-

TABELA 7: (Continuação).

Prova/cultura	<i>Candida famata</i>				<i>Candida versatilis</i>		<i>Candida pintolopesii</i> var. <i>pintolopesii</i>				
	31	38	39	43	34	288	26	285	291	356	502
Pigmento	b	b	b	b	b	b	b	b	b	c	b
Pseudomicélio	-	-	-	-	-	-	-	F	+	-	F
Ascosporos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Brotamento	bm	bm	bm	bm	bm	bm	bm	bm	bm	bm	bm
F. Glicose	F	F	+	F	+	+	+	+	+	+	+
F. Galactose	F	-	-	-	+	F	-	-	-	-	-
F. Sacarose	F	F	+	F	-	+	-	-	-	-	-
F. Maltose	-	-	-	-	F	F	-	-	-	-	-
F. Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F. Rafinose	F	F	-	F	-	-	-	-	-	-	-
Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Sacarose	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
Maltose	+	+	+	+	+	F	-	-	-	-	-
Celobiose	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Trealose	+	+	+	+	F	-	-	-	-	-	-
Lactose	-	-	-	-	-	F	-	-	-	-	-
Rafinose	+	+	+	+	-	F	-	-	-	-	-
Amido	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
D-Xilose	F	F	+	+	-	-	-	-	-	-	-
L-Arabinose	F	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
D-Arabinose	F	-	-	-	F	-	-	-	-	-	-
D-Ribose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Ramnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eritritol	+	-	-	F	-	-	-	-	-	-	-
Ribitol	+	F	+	+	-	-	-	-	-	-	-
D-Manitol	+	+	+	+	-	F	-	-	-	-	-
Ac. succínico	F	F	F	F	-	-	-	-	-	+	-
Ac. Cítrico	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Sorbose	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
Melibiose	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Melezitose	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
Inulina	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Etanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glicerol	F	+	F	F	F	F	-	-	-	-	-
Dulcitol	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Glucitol	+	-	-	+	+	F	-	-	-	-	-
Salicina	-	-	-	+	-	-	F	+	+	-	-
Ac. Lático	F	F	F	+	-	-	-	-	-	-	-
Metanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cicloheximida 100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cicloheximida 1000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NaCl 10%	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+
KNO ₃	-	-	-	-	F	+	F	-	-	-	-
NaNO ₂	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Lisina	-	-	-	+	F	+	+	+	+	+	-
Etilamina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VFB	+	+	+	+	-	F	-	-	-	-	-
37°C	-	-	+	+	-	-	-	F	F	+	+
DBB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arbutina	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Reação de Iodo	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Prod Ácido	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
50% de Glicose	+	+	F	+	+	+	+	+	+	-	+
Balistosporos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

TABELA 7: (continuação).

prova cultura	<i>Candida</i> <i>nitrativorans</i>		<i>Candida</i> <i>quercitrusa</i>			<i>Candida</i> <i>guilliermondii</i>			<i>Candida</i> <i>torresii</i>	
	37	243	41	48	294	42	85	491	44	86
pigmento	b	b	b	b	<i>c</i>	b	b	b	b	b
Pseudomicélio	-	-	-	+	+	F	-	+	-	-
Ascosporos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Brotamento	bm	bm	bm	bm	bm	bm	bm	bm	bm	bm
F. Glicose	<i>F</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
F. Galactose	<i>F</i>	+	<i>F</i>	<i>F</i>	-	+	+	-	+	-
F. Sacarose	<i>F</i>	+	-	-	+	+	+	+	-	<i>F</i>
F. Maltose	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
F. Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F. Rafinose	-	<i>F</i>	-	-	-	<i>F</i>	-	<i>F</i>	-	-
Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	<i>F</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
Sacarose	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Celobiose	+	<i>F</i>	-	-	-	+	+	+	+	+
Trealose	-	<i>F</i>	+	+	+	+	+	+	+	<i>F</i>
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rafinose	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-
Amido	-	-	-	-	-	<i>F</i>	-	-	-	-
D-Xilose	+	<i>F</i>	<i>F</i>	<i>F</i>	<i>F</i>	+	+	<i>F</i>	+	+
L-Arabinose	+	<i>F</i>	-	-	-	+	+	<i>F</i>	+	<i>F</i>
D-Arabinose	-	<i>F</i>	-	-	-	<i>F</i>	-	<i>F</i>	+	-
D-Ribose	-	<i>F</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Ramnose	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
Eritritol	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Ribitol	+	<i>F</i>	-	-	-	+	+	+	+	+
D-Manitol	+	+	<i>F</i>	+	-	+	+	+	+	+
Ac. succínico	-	+	-	-	-	<i>F</i>	+	<i>F</i>	+	+
Ac. Cítrico	-	<i>F</i>	-	-	-	<i>F</i>	+	+	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Sorbose	+	-	+	-	-	<i>F</i>	<i>F</i>	+	+	<i>F</i>
Melibiose	+	+	-	-	-	+	+	<i>F</i>	<i>F</i>	+
Melezitose	-	+	+	+	<i>F</i>	+	+	<i>F</i>	<i>F</i>	+
Inulina	-	-	<i>F</i>	-	-	+	+	-	-	-
Etanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glicerol	-	+	-	<i>F</i>	+	<i>F</i>	+	+	+	+
Dulcitol	-	-	-	-	-	+	+	<i>F</i>	-	+
Glucitol	+	+	-	+	+	+	+	+	+	<i>F</i>
Salicina	+	-	-	-	-	<i>F</i>	+	+	<i>F</i>	<i>F</i>
Ac. Láctico	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-
Metanol	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Cicloheximida 100	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Cicloheximida 1000	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
NaCl 10%	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-
KNO ₃	<i>F</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-
NaNO ₂	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Lisina	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
Etilamina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VFB	-	+	<i>F</i>	-	+	-	+	-	-	-
37°C	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-
DBB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arbutina	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+
Reação de Iodo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Prod Ácido	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
50% de Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Balistosporos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

TABELA 7: (continuação).

prova/cultura	<i>Candida</i> <i>citrea</i>		<i>Candida</i> <i>pseudo-intermedia</i>	<i>Candida</i> <i>valida</i>			<i>Candida</i> <i>parapsilosis</i>	<i>Candida</i> <i>sonkii</i>
	80	82	83	84	486	501	245	246
pigmento	b	b	c	b	b	b	b	c
Pseudomicélio	+	+	+	+	+	+	+	-
Ascosporos	-	-	-	-	-	-	-	-
Brotamento	bm	bm	bm	bm	bm	bm	bm	bm
F. Glicose	F	+	F	F	+	F	+	-
F. Galactose	-	-	F	-	-	-	+	-
F. Sacarose	-	-	+	-	-	-	F	-
F. Maltose	-	-	+F	-	-	-	-	-
F. Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-
F. Rafinose	-	-	F	-	-	-	-	-
Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	-	-	+	-	-	-	+	F
Sacarose	-	-	F	-	-	-	+	-
Maltose	-	-	+	-	-	-	+	-
Celobiose	-	-	+	-	-	-	-	-
Trealose	-	-	+	-	-	-	F	+
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-
Rafinose	-	-	+	-	-	-	-	-
Amido	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Xilose	-	-	-	-	-	-	F	+
L-Arabinose	-	-	F	-	-	-	+	F
D-Arabinose	-	-	+	-	-	-	-	-
D-Ribose	-	-	F	-	-	-	-	-
L-Ramnose	-	-	-	-	-	-	-	-
Eritritol	-	-	-	-	-	-	-	-
Ribitol	+	-	+	-	-	-	+	-
D-Manitol	-	-	+	+	-	-	+	F
Ac. succínico	+	+	F	+	-	+	-	F
Ac. Cítrico	-	-	+	-	-	+	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Sorbose	-	-	+	-	-	-	F	+
Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	-
Melezitose	-	-	+	-	-	-	F	-
Inulina	-	-	+	-	-	-	F	-
Etanol	-	-	-	-	-	-	-	-
Glicerol	+	-	-	+	F	+	+	F
Dulcitol	-	-	+	-	-	-	-	F
Glucitol	-	-	+	-	-	-	+	-
Salicina	-	-	+	-	-	-	-	-
Ac. Lático	-	-	-	-	-	-	-	-
Metanol	-	-	-	-	-	-	-	-
Cicloheximida 100	-	-	-	-	-	-	-	-
Cicloheximida 1000	-	-	-	-	-	-	-	-
NaCl 10%	-	-	+	+	+	+	+	-
KNO ₃	-	-	-	-	-	-	-	-
NaNO ₂	-	-	-	-	-	-	-	-
Lisina	-	-	-	-	-	+	-	-
Etilamina	-	-	-	-	-	-	-	-
VFB	-	-	F	-	-	-	F	-
37°C	-	-	-	-	+	-	+	-
DBB	-	-	-	-	-	-	-	+
Urease	-	-	-	-	-	-	-	+
Arbutina	+	-	+	-	-	-	-	+
Reação de Iodo	-	-	-	-	-	-	-	+
Prod Ácido	+	+	+	+	+	+	+	-
50% de Glicose	-	-	+	+	+	+	+	-
Balistosporos	-	-	-	-	-	-	-	-

TABELA 7: (continuação).

prova/cultura	<i>Candida</i> <i>tannotolerans</i>	<i>Candida</i> <i>atmosphærica</i>	<i>Candida</i> <i>friedrichii</i>	<i>Candida</i> <i>boidini</i>		<i>Candida</i> <i>solani</i>
	290	453	454	496	498	503
pigmento	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>
Pseudomicélio	-	+	+	+	+	-
Ascosporos	-	-	-	-	-	-
Brotamento	<i>bm</i>	<i>bm</i>	<i>bm</i>	<i>bm</i>	<i>bm</i>	<i>bm</i>
F. Glicose	+	+	+	+	+	<i>F</i>
F. Galactose	<i>F</i>	<i>F</i>	+	-	-	-
F. Sacarose	+	-	-	-	-	-
F. Maltose	-	-	-	-	-	-
F. Lactose	-	-	-	-	-	-
F. Rafinose	-	-	-	-	-	-
Glicose	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	-
Sacarose	-	+	+	-	-	+
Maltose	-	+	<i>F</i>	-	<i>F</i>	+
Celobiose	-	+	+	-	-	<i>F</i>
Trealose	-	+	+	-	<i>F</i>	<i>F</i>
Lactose	<i>F</i>	-	-	-	-	-
Rafinose	<i>F</i>	-	+	-	-	-
Amido	-	-	-	-	-	-
D-Xilose	+	+	+	+	+	+
L-Arabinose	-	+	<i>F</i>	-	-	-
D-Arabinose	-	+	+	-	-	-
D-Ribose	-	+	+	+	+	-
L-Ramnose	-	-	-	-	-	-
Eritritol	-	+	+	+	+	-
Ribitol	-	+	+	+	+	-
D-Manitol	-	+	+	+	+	-
Ac. succínico	+	+	+	+	+	+
Ac. Cítrico	-	+	+	-	-	+
Inositol	-	-	-	-	-	-
L-Sorbose	-	+	+	-	-	<i>F</i>
Melibiose	-	-	<i>F</i>	-	-	-
Melezitose	-	+	+	-	-	<i>F</i>
Inulina	-	-	-	-	-	-
Etanol	-	-	-	-	-	-
Glicerol	<i>F</i>	+	<i>F</i>	+	+	+
Dulcitol	-	-	+	-	-	-
Glucitol	<i>F</i>	+	+	+	+	-
Salicina	-	+	+	-	-	+
Ac. Láctico	-	-	-	+	+	+
Metanol	-	-	-	<i>F</i>	<i>F</i>	-
Cicloheximida 100	-	-	-	-	-	-
Cicloheximida 1000	-	-	-	-	-	-
NaCl 10%	-	+	+	+	+	+
KNO ₃	-	-	-	+	+	-
NaNO ₂	-	-	-	-	+	-
Lisina	-	+	-	-	-	+
Etilamina	-	-	-	-	-	-
VFB	-	-	-	-	-	-
37°C	-	-	-	-	-	-
DBB	-	-	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-	-	-
Arbutina	-	+	+	-	-	-
Reação de Iodo	-	-	-	-	-	-
Prod Ácido	+	+	+	+	+	+
50% de Glicose	<i>F</i>	+	+	+	-	+
Balistosporos	-	-	-	-	-	-

TABELA 7: (continuação).

prova/cultura	<i>Candida sake</i>					<i>Candida fructus</i>	<i>Candida bacarum</i>	<i>Candida Sp</i>	
	26	32	87	90	244	287	248	B 295	A 355
pigmento	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>b</i>	<i>c</i>
Pseudomicélio	+	+	-	-	-	-	-	+	+
Ascosporos	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Brotamento	<i>bm</i>	<i>bm</i>	<i>bm</i>	<i>bm</i>	<i>bm</i>	<i>bm</i>	<i>bm</i>	<i>bm</i>	<i>bm</i>
F. Glicose	+	+	+	+	+	+	-	+	<i>F</i>
F. Galactose	+	+	<i>F</i>	<i>F</i>	+	-	-	<i>F</i>	-
F. Sacarose	-	-	+	+	+	<i>F</i>	-	+	<i>F</i>
F. Maltose	-	-	<i>F</i>	+	<i>F</i>	<i>F</i>	-	-	-
F. Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F. Rafinose	-	-	-	-	<i>F</i>	-	-	<i>F</i>	-
Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	-	-	+	-
Sacarose	+	+	+	-	+	-	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	-	+	+	-
Celobiose	+	-	+	-	+	-	<i>F</i>	+	-
Trealose	+	+	<i>F</i>	+	<i>F</i>	+	+	+	-
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rafinose	-	+	+	<i>F</i>	+	-	+	+	<i>F</i>
Amido	-	-	-	-	-	-	+	-	-
D-Xilose	+	<i>F</i>	<i>F</i>	+	<i>F</i>	+	+	<i>F</i>	-
L-Arabinose	-	-	-	-	-	-	<i>F</i>	<i>F</i>	-
D-Arabinose	-	-	-	-	-	-	+	<i>F</i>	-
D-Ribose	-	-	-	-	-	-	<i>F</i>	-	-
L-Ramnose	-	-	-	-	<i>F</i>	-	-	-	-
Eritritol	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Ribitol	<i>F</i>	-	-	-	-	<i>F</i>	+	+	-
D-Manitol	+	+	<i>F</i>	+	+	+	+	+	-
Ac. succínico	<i>F</i>	+	+	+	+	+	<i>F</i>	+	+
Ac. Cítrico	<i>F</i>	+	+	+	<i>F</i>	+	<i>F</i>	<i>F</i>	+
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Sorbose	+	+	<i>F</i>	+	<i>F</i>	+	-	+	-
Melibiose	-	-	-	-	-	-	+	<i>F</i>	-
Melezitose	+	+	+	+	+	-	+	<i>F</i>	-
Inulina	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Etanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glicerol	+	+	<i>F</i>	<i>F</i>	+	-	+	+	-
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	<i>F</i>	-
Glucitol	+	+	<i>F</i>	+	+	+	+	+	-
Salicina	<i>F</i>	<i>F</i>	+	<i>F</i>	<i>F</i>	-	<i>F</i>	+	-
Ac. Láctico	<i>F</i>	<i>F</i>	-	-	-	-	<i>F</i>	-	-
Metanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cicloheximida 100	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cicloheximida 1000	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NaCl 10%	+	+	-	-	-	-	+	+	+
KNO ₃	-	-	-	-	-	-	+	-	-
NaNO ₂	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Lisina	+	-	+	+	-	+	-	-	+
Etilamina	-	-	-	+	-	-	+	-	-
VFB	-	-	+	-	+	-	-	-	-
37°C	-	-	-	-	-	-	-	+	-
DBB	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Urease	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Arbutina	+	+	+	<i>F</i>	+	-	+	+	-
Reação de Iodo	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Prod Ácido	+	+	+	+	+	+	+	+	+
50% de Glicose	+	+	-	+	+	+	+	+	-
Balistosporos	-	-	-	-	-	-	-	-	-

TABELA 8: Perfil de distribuição das diferentes coenzimas-Q no gênero *Candida*.

Espécie	isolado nº	Valor da literatura	Perfil de Coenzima-Q (%)				
			Q ₁₀	Q ₉	Q ₈	Q ₇	Q ₆
<i>C. famata</i>	31	Q-9		90	9		
	38			100			
	39			100			
	43			87			13
<i>C. quercitrusa</i>	41	Q-9		90	10		
	48			83	5	11	
	294			86	9	4	
<i>C. citrea</i>	80	Q-7				86	14
	82				1	90	6
<i>C. pintolopesii</i>	36	Q-6					100
var. <i>pintolopesii</i>	285					1	98
	291					2	98
	356						100
	502					24	75
<i>C. guilliermondii</i>	42	Q-9		95	5		
	85			95	5		
	491		5	57	7	14	17
<i>C. bombi</i>	25	Q-9		70	20	7	3
	27			75	17	3	4
<i>C. nitrativorans</i>	37	Q-9		100			
	243			85	11	4	
<i>C. valida</i>	84	Q-7				92	8
	486				1	94	5
	501					73	27
<i>C. sake</i>	26	Q-9		100			
	32			100			
	87			95	5		
	90			68	19		
	244			88	8	3	
<i>C. solani</i>	503	Q-7			2	94	4
<i>C. boidini</i>	496	Q-7			2	94	4
	498				2	95	3
<i>C. versatilis</i>	288	Q-9		75			24
	34			69	26	4	
<i>C. pseudointermedia</i>	83	Q-9		62	3	32	2
<i>C. parapsilosis</i>	245	Q-9		71		28	
<i>C. torresii</i>	44	Q-9		68	30	5	
	86			90	10		
<i>Candida sp A</i>	355					85	14
<i>Candida sp B</i>	295					98	2

5 - CONCLUSÕES

- 1- A maioria das leveduras isoladas dos três locais de coleta ao longo do rio Una do Prelado foi caracterizada como leveduras ascomicéticas.
- 2- Foi constatado diferenças significativas na microbiota nos três locais de coleta.
- 3- Entre as leveduras isoladas, 70 % são fermentativas, prevalecendo a sua dominância sobre as oxidativas.
- 4- O gênero *Candida* foi o mais freqüente nos três locais de coleta 67,14% do total de isolados, seguido pelo gênero *Rhodotorula* (com 12, 8%).
- 5- Foram isoladas seis linhagens produtoras de esporos (8,6% do total).
- 6- Os gêneros *Trichosporon*, *Sporobolomyces*, *Cryptococcus*, *Saccharomyces*, *Williopsis*, *Fellomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Aureobasidium* e *Kluyveromyces* foram isolados ao longo do Rio Una do Prelado.
- 7- Os gêneros típicos de rio foram: *Trichosporon*, *Cryptococcus* e *Saccharomyces*.
- 8- Os gêneros típicos de mangue foram: *Fellomyces* e *Zygosaccharomyces*.
- 9- Não foi detectado nenhum gênero exclusivo da região de estuário.
- 10- O gênero *Candida* foi comum nos três locais de coleta. O gênero *Rhodotorula* ocorreu em rio e estuário. Os gêneros *Kluyveromyces*, *Aureobasidium* e *Williopsis* foram comuns em mangue e estuário. O gênero *Sporobolomyces* foi comum em rio e mangue.
- 11- A osmotolerância foi uma característica freqüente entre as leveduras isoladas. Das linhagens, 45,7% cresceram em alta salinidade e 80% cresceram em meio com alta concentração de glicose. Podendo ser uma característica importante tendo em vista a sua possível aplicação industrial.
- 12- O baixo número de coletas não permitiu a correlação conclusiva entre população alóctone e autóctone.

- 13- A análise do perfil de coenzima-Q demonstrou ser uma ferramenta valiosa para o auxílio da identificação de espécies de *Candida*.
- 14- O gênero *Candida* pode ser separado em três grupos, baseados no tipo de coenzima Q predominantes Q-6, Q-7 e Q-9 respectivamente.
- 15- *Candida famata*, *C. quercitrusa*, *C. guilliermondii*, *C. bombi*, *C. nitrativorans*, *C. sake*, *C. versatilis*, *C. pseudointermedia*, *C. parapsilosis* e *C. torresii* apresentaram a Co-Q 9.
- 16- *C. citrea*, *C. valida*, *C. solani*, *C. boidini* e as duas linhagens *Candida sp* apresentaram a Co-Q 7.
- 17- *Candida pintolopesii* var. *pintolopesii* apresentou a Co-Q 6.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHERAN, D. G.; ROTH JR, F. J.; MEYERS, S. P. Ecology and characterization of yeast from aquatic region of south Florida. **Marine Biological**, New York, v.1, p. 291 - 308, 1968.
- ANÔNIMO, P. Levantamento e reconhecimento dos solos do Estado de São Paulo, Brasil. **Boletim de Serviço Nacional em Pesquisas Agronômicas**, São Paulo, 634p., 1960.
- APOLINÁRIO, M. E. S.; MILANEZ, A. I. Leveduras e leveduróides de corpos d' água da região da Grande São Paulo. 1. *Debaryomyces* Lodder; *Kreger-Van Rij*, *Hansenula* H. Sydow e *Pichia* Hansen. **Rickia**, São Paulo, v. 12, p. 15 - 27, 1985a.
- APOLINÁRIO, M. E. S.; MILANEZ, A. I. Leveduras e leveduróides de corpos d' água da Região do Grande São Paulo. 2. *Candida* Berkhout. **Rickia**, São Paulo, v. 12, p. 59 - 75, 1985b.
- APOLINÁRIO, M. E. S.; MILANEZ, A. I. Leveduras e leveduróides de corpos d' água da Região do Grande São Paulo. 3. *Cryptococcus* Kützing Emend. Phaaff; Spencer, *Kloeckera* Janke, *Rhodotorula* Harrison e *Torulopsis* Berlesse. **Rickia**, São Paulo, v. 13, p. 1-15, 1986a.
- APOLINÁRIO, M. E. S.; MILANEZ, A. I. Leveduras e leveduróides de corpos d' água da Região do Grande São Paulo. 4. *Trichosporon* Behrend e *Aureobasidium* Viala; Boyer. **Rickia**, São Paulo, v. 13, p. 61 - 68, 1986b.
- APOLINÁRIO, M. E. S. **Levantamento de leveduras e leveduroides de corpos da região da grande São Paulo**. Rio Claro, 1984. 189p. Dissertação (Mestrado - Biologia Vegetal) - Instituto de Biociências - Universidade Estadual Paulista.
- ATILLI, D. S.; ZAVATINI, J. A.; PINTO, I. M. A. Características climáticas da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, Mata Atlântica, São Paulo. **Geografia**, Rio Claro, v.20, n. 1, p. 1-12; 1995.
- AUGUSTYN, O. P. H.; FERREIRA, D.; KOCK, J. L. F. Differentiation between yeasts species and strains within a species by celular acid analysis. **Systematic Applied Microbiology**, Stuttgart, v.14, p. 324-334, 1991.
- BARNETT, J. A. The nutritional test in yeast systematics. **Journal of General Microbiology**, London, v. 99, p. 183 - 190, 1977.
- BARNETT, J. A.; PAINE, R. W.; YARROW, D. **Yeast: characteristics and identification**. Cambridge, Cambridge: University Press, 1983. 811p.

- BARNETT, J. A.; PAINE, R. W.; YARROW, D. **Yeast**: characteristics and identification. Cambridge, Cambridge: University Press, 1990. 1002p.
- BELIN, J. M. Identification of yeasts and yeasts like fungi. 1. Taxonomy and characteristics of new species describes since 1973. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 27, p. 1235-1251, 1981.
- BENDOÁ, O.; RICHTER, V.; JANDEROVA, B.; HÄUSLER, J. Identification of industrial yeasts strains of *Saccharomyces cerevisiae* by fatty acid profiles. **Applied Microbial and Biotechnology**, Berlin, v.35, p. 810-812, 1991.
- BILLON GRAND, G. Influence on minor peaks of coenzyme Q of the glucose concentration in the growth cycle and the duration of the coenzyme Q extraction: required condition for determining the minor coenzyme Q. **Journal of the General Applied Microbiology**, Washington, v. 35. p. 261-268, 1989.
- BILLON-GRAND, G. Minor ubiquinone of the yeast coenzyme Q system: importance in the taxonomy of the yeasts. **Journal of the General Applied Microbiology**, Washington, v. 33, p. 381-390, 1987.
- BULL, A. T.; GOODFELLOW, M.; SLATER, J. H. Biodiversity as a source of innovation in biotechnology. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 46, p 219- 252, 1992.
- CAPOBIANCO, J. P. R. **Curso sobre a Estação Ecológica de Juréia-Itatins**. Peruibe; Associação em Defesa da Juréia, 1987. 43p (apostila).
- CARMO DE SOUZA, L. Distribution of yeasts in natura, In: Rose, A. H.; Harrison, J.S. ed. **The Yeasts**: biology of the yeasts. London: Academic Press, 1969, v.1, p 79 - 106.
- CARNEIRO DA PAIXÃO, L. S. **Estação Ecológica de Juréia-Itatins**. São Paulo: SEMA - Coordenadoria de Estudos de Ecossistemas, 1984. 44p.
- CASTRO, M. M. S: **Leveduras contaminantes do processo de fermentação alcoólica**: diversidade taxonômica e metabólica, Campinas, 1995. 124p. Tese (Mestrado em ciências de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Unicamp.
- CLARKE, C. F.; WILLIAMS, W.; TERUYA, J. H. Ubiquinone biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: Isolation and sequence of COQ3 the 3,4 - dihydroxy - 5 hexaprenylbenzoate methyltransferase gene. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 266, n.25, p 16636 - 16644, 1991.
- COLLINS, M. D.; JONES, D. Distribution of isoprenoid quinone structural types in bacterial and their taxonomic implications. **Microbial Reviews**, Reading, v. 54, n. 2, p 316 - 354, 1981.

- COLLINS, M. D.; JONES, D. Lipids in the classification and identification of coryneform bacteria containing peptidoglycans based on 2,4 - diaminobutyric acid (DAB). **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 48, p 459 - 470, 1980.
- COLLINS, M. D. Isoprenoid Quinones. In: **Chemical Methods in Prokaryotic Systematics**. London: John Wiley; 1994, chap. 8, p 265 - 309.
- COMI, G; RUFFONI, B.; CANTONI, C.; PESINO, L. Indagine ecologica sui lieviti delle acque di alcune specie di pesci del lago Maggiore. **Archivo Veterinário Italiano**, Milano, v.34, n.1, p 1-19, 1983.
- CORTESÃO, J. **Juréia: a luta pela vida**. Rio de Janeiro: Ed. Index, 1989. 133p.
- DAVENPORT, R. P. An Introduction to yeast and yeastlike organisms In: SKINNER, F. A.; PASSMORE, S. M.; DAVENPORT, R. R. **Biology and activities of yeasts**. London: Academic Press, 1980. 1 -23p.
- DOMSCH, K. H.; GAMS, W; ANDERSON, T-H. **Compendium of soil fungi**. p.130 - 134. Ecching: IHW-Verlag, 1993. v. 1.
- FELL, J. W.; KURTZMAN, C. P. Nucleotide sequence analysis of a variable Region of the large subunit rRNA for identification of Marine - Occuring yeast. **Current Microbiology**, New York, v. 21, p. 295 - 300, 1990.
- FELL, J. W.; VAN UDEN, N. Yeasts in marine environments, OPPENHEIMER, H. C. **Symposium on marine microbiology**. Springfield: Thomas, Publ. 1963. p. 329 - 340.
- FONSECA, A. Utilization of tartaric acid and related compounds by yeasts: taxonomic implications. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 38, p. 1242 - 1251, 1992.
- FREIRE-PICOS, M. A.; RODRIGUEZ-TORRES, A. M.; ESPERANZA, C. M. In: Yeast phylogenetic relationships based on cytochrome c sequences. **Microbios**, cambridge, v. 81, n. 326, p. 23 - 27, 1995.
- FUKUMAKI, T.; INOVE, A.; MORIJA, K.; HORIHOSHI, K. Isolation of a marine yeast that degrades hydrocarbon in the presence of organic solvent. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, New York, v. 58, n. 10, p 1784 - 1788, 1994.
- GOODFELLOW, M.; O'DONNELL, A. Roots of bacterial systematics. In: **Curso Actinomycetes in Industry and Environment**. 7 - 15 July, 1992. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia "André Tosello".

- GOTO, S.; OHWADA, K.; YAMASATO, K. Identification of yeasts isolated from seawater and sediment in Aburatsubo inlet. **Journal of the General Applied Microbiology**, Washington, v.20, p. 317-322, 1974a.
- GOTO, S.; YAMASATO, K.; IIZUKA, H. Identification of yeasts isolated from the Pacific Ocean. **Journal General Applied Microbiology**, Washington, v.20, p. 309 - 316, 1974b.
- GOVIND, N. S.; BANASZAK, A. T. Isolation and characterization of an autonomously replicating sequence (arsd) from the marine yeast *Debaromyces hansenii*. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, v.1, n. 3, p. 215 - 218, 1992.
- GUNASSEKARAN, M.; HUGHER, W. T. Gas-liquid chromatography: a rapid method for identification of different species of *Candida*. **Mycologia**, New York, v. 72, p.505-511, 1980.
- HAGLER, A. N. **Ecologia e taxonomia de leveduras em um estuário poluído e ambientes marinhos do Rio de Janeiro**. Rio de Janeiro, 1978, 440p. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- HAGLER, A. N.; AHERAN, D. G. Rapid Diazonium Blue Test to detect Basidiomycetous yeasts. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 31, n.2, p. 204 - 208, 1981.
- HAGLER, A. N.; AHERAN, D. G. Ecology of aquatic yeasts. ROSE, A. H.; HARRISON, J. S.. In: **The Yeasts**. 2 ed. London: Academic Press. 1987. v.1. p. 181-199.
- HAGLER, A. N.; MENDONÇA - HAGLER, L. C. A Diazonium Blue B test for yeasts grown three days on yeasts carbon base urea agar. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 71 - 74, 1991a.
- HAGLER, A. N.; ROSA, C. A.; MORAIS, P. B.; MENDONÇA-HAGLER, L. C.; FRANCO, G. M. O.; ARAÚJO, F. V.; SOARES, C. A. G. Yeast and coliform bacteria of water accumulated in bromelias of mangrove and sand dune ecosystem of southeast Brazil. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.39, n. 10, p. 973 - 977, 1993.
- HAGLER, A. N.; MENDONÇA - HAGLER, L. C. Yeast for biotechnology. In: **Curso - leveduras para biotecnologia**, Campinas, SP: Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia "André Tosello", 1991b (apostila).
- HARA, N.; TUBOTA, T.; SAITO, K.; SUTO, T. Biochemical characteristics and ubiquinone of 44 strains of *Trichosporon beigelli* and related organisms. **Journal of the General Applied Microbiology**, Washington, v. 35, p. 1-10, 1989.

- HARDY, M. S. A. Yeast microflora of some aquatic habitats El - Minia Governorate, Egypt. **Korean Journal of Mycology**, Seoul, v. 21, n. 2, p. 127 - 132, 1993.
- HEARD, G. M.; FLEET, G. H. A convenient microtitre assay procedure for yeasts identification. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 68, p. 447-451, 1990.
- HERNANDEZ - SAAVEDRA, N. Y.; OCHOA, J. L.; VAZQUEZ DULHALT, R. Effect of salinity in the growth of the marine yeast *Rhodotorula rubra*. **Microbios**, v.80, n.323, p. 99 - 106, 1994.
- HERNANDEZ - SAAVEDRA, N. Y.; OCHOA, J. L.; VAZQUEZ DULHALT, R. Osmotic adjustment in marine yeast. **Journal of Plankton Research**, London, v. 17, n. 1, p. 59 - 69, 1995.
- JONES, J. G. Diversity in Freshwater Microbiology. In: **Ecology of Microbial Communities**. Cambridge: University Press, 1987. p 235-259.
- KOHLMEYER, J.; KOHLMEYER, E. The higher fungi. In: KOHLMEYER, J.; KOHLMEYER, E. **Marine Mycology**. New York: Academic Press, 1979. p. 556-606.
- KOMAGATA, K.; SUZUKI, K-I. Lipid and cell-wall analysis in bacterial systematics. **Methods in Microbiology**, New York, v. 19, p. 163-207, 1973.
- KREGER VAN-RIJ, N. J. W. **The yeast: a taxonomic study**. 3 ed. Amsterdam: Elsevier, 1984, 1082p.
- KURTZMAN, C. P. Identification and taxonomy. In: KIRSOP, B. E.; KURTZMAN, C. P. ed. **Living resources for biotechnology: yeasts**, New York: Cambridge, 1988, p. 99 - 140.
- KURTZMAN, C. P.; PHAFF, H. J. Molecular taxonomy. In: ROSE, A. H.; HARRISON, J. S. ed. **The Yeasts: biology of the yeasts**. London: Academic Press, 1969 v. 1, p 63 - 94.
- LANGEANI FILHO, W. L. **Estudos preliminares em três áreas da Estação Ecológica de Juréia-Itatins sujeitas a influência Antropica: Itinguçu, Guarau e Praia da Juréia**. São Carlos, 1989. 82p (monografia -graduação). Universidade Federal de São Carlos.
- LEE, F-U.; LEE, C-F.; OKADA, S.; UCHIMURA, T.; KOMAGATA, K.; KOZOKI, M. *Candida galacta* a new combination for *Candida apis* var. *galacta*. **International Journal of Systematics Bacteriology**, Washington, v. 34, n. 1, p. 183-184, 1993.

- LIU, Z.; KURTZMAN, C. P. Phylogenetic relationships among species of *Williopsis* and *Saturnospora*, new genus determined from partial ribosomal RNA sequences. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 60, n. 1, p. 21 - 30, 1991.
- LODDER, J. **The Yeasts: a taxonomic study**. Amsterdam: North Holland Publ., 1970. 1385p.
- LOPES, R. M.; POR, F. D. Tipos fluviais da área de Juréia-Itatins e Baixo Ribeira (São Paulo). In: **II -Simposio de Ecossistemas da Costa Sul e Sudeste brasileira, estrutura função e manejo**, vol. 2. Academia de Ciência do Estado de São Paulo, Aguas de Lindóia, SP. Publicação Aciesp, 71 (2), 1990
- LOTT, T. J.; KUYKENDALL, R. J.; REISS, E. Nucleotide sequence analysis of the 58s rDNA and adjacent IT S2 region of *Candida albicans* and related species. **Yeast**, Amsterdam, v. 9, n. 11, p. 1199 - 1206, 1993.
- MEYERS, S. P.; AHERAN, D. G.; COOK, W. L. Mycological studies of lake Champlain. **Mycologia**, New York, v. 62, p. 504-515, 1970.
- MOK, W. Y.; LUIZÃO, R. C. C.; SILVA, M. S. B.; TEIXEIRA, M. F.; MUNIZ, E. G. Ecology of pathogenic yeasts in Amazonian soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 48, n. 2, p. 390-394, 1984.
- MONTRACHER, R.; CLAISSE, M. L. Spectrophotometric analysis of some *Candida* species and related yeasts: significance in taxonomy. **Celular and Molecular Biology**, New York, v. 33, n. 3, p. 313-323, 1987.
- MONTRACHER, R.; BILLON GRAND; CLAISSE, M. Analyses of cytochromes and coenzymes Q in the yeasts genus *Candida*. **Journal of the General Applied Microbiology**, Washington, v. 36, p. 151-161, 1990.
- NAKASE, T.; SUZUKI, M. Taxonomic studies on *Debaryomyces hansenii* (Zopf) Lodder et Kreger-van Rij and related species. 1 Chematoxonomic investigations. **Journal of the General Applied Microbiology**, Washington, v. 31, n. 1, p. 49-69, 1985.
- NAKASE, T.; SUZUKI, M. The Ubiquinone system in strains of species in the Ballistospore-forming yeast genera *Sporodiobolus*, *Sporobolomyces* and *Bullera*. **Journal of the General Applied Microbiology**, Washington, v. 32, n. 2, p. 251 - 258, 1986.
- NAKASE, T.; SUZUKI, M.; TAKASHIMA, M.; HAMAMOTO, M.; HATANO, F.; FUKUI, S. A taxonomic study on cellulytic yeast and yeast-like microorganisms isolated in Japan I. Ascomycetous yeast genera *Candida* and *Williopsis*, and yeast-like genus *Prototheca*. **Journal of the General and Applied Microbiology**, Washington, v. 40, n. 6, p. 519 - 531, 1994.

- NAVARRA, C. T. Fácies Hidroquímicas dos Rios Planície Costeiras Sul Paulista. **Acta Limnologia**, São Carlos, v.2, p. 931 - 942, 1988.
- NEWELL, S. Y.; FELL, J. W. The Perfect form of a marine occurring yeast of the genus *Rhodotorula*. **Mycologia**, New York, v. 62, p. 272 - 281, 1970.
- OHKUMA, M.; HWANG, C. W.; MASUDA, Y.; NISHIDA, H.; SUGYAMA, J.; OHTA, A.; TAKAGI, M. Evolutionary position of n-alkane-assimilating yeast *Candida maltosa* shown by nucleotide sequence of small-subunit ribosomal RNA gene. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, New York, v.57, n.10, p. 1793 - 1794, 1993.
- OLSEN, I.; BRANDZ, I. Review of chemosystematics: multivariate approaches to oral bacteria and yeasts. **Acta Odontologica Scandinavica**, Stockholm, v.50, n. 6, p. 321-36, 1992.
- OLSEN, I. Chemataxonomy of yeasts. **Acta Odontologica Scandinavica**, Stockholm, v. 48, p. 19 - 25, 1990.
- PAGNOCCA, F. G.; MENDONÇA - HAGLER, L. C.; HAGLER, A. N. Yeasts associated with the white shrimp *Peneaus schitti*, sediment, and water of Sepeteba bay, Rio de Janeiro, Brazil. **Yeast**, Amsterdam, v. 5, suppl., p 479 - 483, 1989.
- PARDO, V. C. Microbiologia Y meyo ambiente. Los microorganismos como indicadores de Contaminacion. **Boletim Micológico**, Rio Claro, v. 1, p. 181 - 184, 1983.
- PAULA, L. R.; PURCHIO, A.; GAMBLE, W. Yeast from beaches in the southern area of São Paulo State "Baixada Santista", Brazil. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 14, n. 2, p. 136 - 143, 1983.
- PEÇANHA, M. P. **Parâmetros microbiológicos da água do Ribeirão Claro (Rio Claro, S.P.)**. Rio Claro, 1993, 130p. Tese (Mestrado em Microbiologia), Instituto de Biociência - Universidade Estadual Paulista.
- PHAFF, H. J. STARMER, W. T. Yeasts associated with plants, insects and soil. In: ROSE, H.; HARRISON, J. S. eds **The Yeasts: biology of yeasts**. London: Academic Press, 1987, p 123 - 180, v 1.
- PHAFF, H. J.; MILLER, M. W.; MRAK, E. M. **The life of yeasts**. Massachussets: Harward University Press, 1966. p. 93-123.
- PHAFF, H. J.; MILLER, M. W.; MRAK, E. M. **The life of yeasts**. 2ed. Massachussets: Harward Universsity Press, 1978, p1 - 15.
- PHAFF, H. J.; MRAK, E. M.; WILLIAMS, O. B. Yeast isolated from shrimp. **Mycologia**, New York, v. 44, n. 4, p. 273 - 329, 1952.

- PIANTELLI, L. E.; TORO, M. A.; CASANOVA, D. Diversity - Dominance and Sucession of fungal communities in sony soils (a beach of V-region, Chile) on keratinic substrata. **Boletim Micológico**, Rio Claro, v. 2, p. 73 - 89, 1984.
- PINCUS, D. H.; SALKIN, I. F.; HURD, N. J.; LEVY, I. L.; KAMMA, M. A. Modification of potassium nitrate assimilation test for identification of clinical important yeasts. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 1, p. 366 - 368, 1988.
- POR, F. D.; SHIMIZU, G. Y.; ALMEIDA PRADO - POR, M. S.; TÔHA, F. A. L.; OLIVEIRA, I. R. The blackwater river estuary of Rio Una do Prelado (São Paulo, Brasil): preliminary hydrobiological data. **Revista de Hydrobiologia Tropical**, São paulo, v.17, p. 245 - 258, 1984.
- PRADA, G. M. M. **Leveduras associadas à frutas de espécies nativas da estação ecológica da Juréia Itatins (Peruíbe- São Paulo)**. Rio Claro, 1994, 134p. Tese (Mestrado em Microbiologia). Instituto de Biociência, Universidade Estadual Paulista.
- QUEIROZ, L. A. **Análise quanti-qualitativa de leveduras isoladas de Algas Marinhas**. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, Instituto de Micologia, 1972, (Publicação n. 677).
- QUEIROZ, L. A.; MACÉDO, S. J. **Análise quanti-qualitativa de leveduras isoladas de águas marinhas**. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, Instituto de Micologia, 1972 (Publicação n. 676).
- RALE, V. B.; VAKIL, J. R. A note on an improved molybate agar for the selective isolation of yeasts from tropical fruits. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 56, p. 409 - 413, 1984.
- RHEINHEIMER, G. **Microbiologia de las águas**; tradução de Jose Romero Muñoz de Arenillas. 4ed. Zaragoza: Editorial Acibra, 1987, 299p.
- ROBBS, P. G.; HAGLER, A. N.; MENDONÇA - HAGLER, L. C. Yeast associated with a pineapple plantation in Rio de Janeiro, Brazil. **Yeast**, Amsterdam, v. 5, suppl., p. 481 - 484, 1989.
- ROSA, C. A. **Comunidade de leveduras associadas a plantas e insetos em ecossistemas de restinga**, Rio de janeiro, 1993, 108p. Dissertação (Doutorado Ciências biológicas) - Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- ROSA, C. A.; NOVAK, F. R.; de ALMEIDA, J. A. G.; MENDONÇA - HAGLER, I. C.; HAGLER, A. N. Yeast from human milk colleted in Rio de Janeiro, Brazil. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 21, n. 4, p. 361 - 363, 1990.

- SANTOS, E. A. **Correlação entre parâmetros microbiológicos, químicos e físicos em água do mar poluída na zona litorânea do Rio de Janeiro**. Rio de Janeiro 1980. 125p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Ciências biológicas, Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- SCHRANK, A. **Método do número mais provável para contagem de leveduras em ambientes aquáticos poluídos**. Rio de Janeiro, 1982. 150p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Ciências biológicas, Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- SILVA FILHO, J. B. **Avaliação de coliformes e leveduras como indicadores de poluição aquática em rios da Floresta da Tijuca, Rio de Janeiro**. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1988. 127p. Dissertação (Mestrado - Microbiologia).
- SPENCER, D. M.; SPENCER, J. F. T.; FIGUEIROA, LUCIA de; HEKUANE, H. Yeast associated with rotting citrus fruits in Tucumã, Argentina. **Mycology Research**, New York, v. 96, n. 10, p. 891 - 892, 1992.
- SUGYAMA, J.; NAGAL, K.; KOMAGATA, K. Ubiquinone system in strains of species in the black yeasts genera *Phaecocomyces*, *Exophiala*, *Hortae* and *Rhinocladiella*. **Journal of the General Applied Microbiology**, Washington, v. 33, p. 381-390, 1987.
- SUN, X.; WU, B. The phylogeny of yeast: A cladistic analysis. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, Pekim, v. 10, n. 4, p. 371 - 375, 1992.
- SUZUKI, M.; NAKASE, T.; DAENGSUBHA, W.; CHAOWSANGKET, M., SUYANANDANA, P.; KOMAGATA, K. Identification of yeasts isolated from foods and related materials in Thailand. **Journal of the General Applied Microbiology**, Washington, v.33, p. 205-220, 1987.
- SUZUKI, M.; NAKASE, T. *Sporobolomyces gissed flavus* and *Sporobolomyces saiscola*. Two new species of Ballistosporos yeasts isolated from deal leaves of *casa sp* in Japan. **Journal of the General Applied Microbiology**, Washington, v. 33, p. 167-175, 1987.
- SUZUKI, M.; NAKASE, T.; FUKAZAWA, Y. *Candida fragi*, a new species of anamorph yeast isolated from fermenting strowberry. **Journal of the General Applied Microbiology**, Washington, v. 37, p. 423 - 429, 1991.
- SUZUKI, M.; NAKASE, T.; MORI, H.; TORIUMI, H; KURTZMAN, K. Chemotaxonomic Study on Halophili/Halotolerant Yeast in the Matured Soy Sauce Mash. **Bulletin of the Japan Federation for Culture Collections**, v. 8, n. 1, p. 18 - 28, 1992.

- TARIFA, J. R.; TOLEDO, G. S.; COIMBRA, J. S.; WATANABE, A. S.; MATTOS, I. F. A.; COGNOLATO, R.; DUARTE, H. G. **Zoneamento do meio físico da Estação Ecológica de Juréia: Um Projeto Integrado de Pesquisa e Ensino em Geografia**. São Paulo: Instituto de Geografia, USP. 1984.
- TOKUOKA, K.; ISHITANI, T. GOMO, S.; KOMAGATA, K. Identification of yeasts isolated from high - sugar foods. **Journal of the General Applied Microbiology**, Washington, v.31, p. 411 - 427, 1985.
- TOKUOKA, K.; ISITANI, T. Minimum water activities for the growth of yeasts isolated from high - sugar foods. **Journal of the General Applied Microbiology**, Washington, v. 37, p. 11 - 119, 1991.
- VAN UDEN, N.; FELL, J. W. Marine yeasts. In: **Advantes in microbiology of the sea**. London: Academic Press, 1968. p. 332-340.
- VAN-UDEN, N; AHERAN, D. G. Ocurrence and population of yeasts species in a fresh water lake. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v.29, p. 308 - 312, 1963.
- VILJOEN, B. C.; KOCK, J. L. F. A taxonomic study of yeast genus *Candida* Berkhout. **Systematic Applied of Microbiology**, London, v. 12, p. 91 - 102, 1989.
- WEIJMAN, A. C. M.; RODRIGUES, M. L. Carbohydrate patterns of *Candida*, *Cryptococcus* and *Rhodotorula* species. **Antonie von Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 54, n. 6, p. 535 - 543, 1988.
- WEIJMAN, A. C. M.; RODRIGUES de MIRANDA, L. ; VAN DER WALT, J. P. Redefinition of *Candida* Berkhout and the consequent emendation of *Cryptococcus* Kützing and *Rhodotorula* Harrison. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 54, n. 6, p. 545 - 553, 1988.
- WOOLLET, L. L.; HEDRICK, L. R. Ecology of yeasts in poluted water. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 36, p. 427 - 435, 1970.
- YAMADA, Y.; KONDÓ, K. Coenzyme Q system in the classification of the yeast genera *Rhodotorula* and *Cryptococcus*, and the yeast-like genera *Sporobolomyces* and *Rhodospiridium*. **Journal of the General Applied Microbiology**, Amsterdam, v. 19, p. 59-77, 1973.
- YAMADA, Y. ; BANNO, I. Tellomyces, a new anamorphic yeast gênus for the Q-10 equiped organisms whose conidium feed by on two- break in the sterigma. **Journal of the General Applied Microbiology**, Washington, v. 30, p. 523-525, 1984.
- YAMADA, Y.; KONDÓ, K. Taxonomic significance of coenzyme Q system in yeast and yeast-like fungi. **4th International Symposium**, Kyoto, Japan, v. 2, p. 156-157, 1972.

- YAMADA, Y.; KONDÓ, K. The coenzyme Q system in the classification of the ascosporeogenous yeast genus *Dekkera* and the ascosporeogenous genus *Brettanomyces*. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 46, p. 595 - 599, 1980.
- YAMADA, Y.; ARIMOTO, M.; KONDÓ, K. Coenzyme Q system in the classification of the ascosporeogenous yeasts genera *Hansenula* and *Pichia*. **Journal of the General Applied Microbiology**, Washington, v. 19, p. 189-208, 1973.
- YAMADA, Y.; SUGIHARA, K.; van EIJK, G. W.; ROEJMANS, H. J. ; HOOG, G. S. de. Coenzyme Q system in ascomycetous black yeasts. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 56, p.349-356, 1989.
- YAMADA, Y.; ARIMOTO, M. ; KONDÓ, K. Coenzyme Q system in the classification of apiculate yeasts in the genera *Nardsonia*, *Saccharomycoides*, *Kluyveromyces* and *Endomycopsis*. **Journal of the General Applied Microbiology**, Washington, v. 22, p. 325-337, 1976.
- YAMADA, Y.; ARIMOTO, M.; KONDO, K. Coenzyme Q system in the classification of the ascoporeogenous yeasts genus *Shizosaccharomyces* and yeast - like genus *Endomyces*. **Journal of the General Applied Microbiology**, Washington, v.19, p. 353 - 358, 1973.
- YAMADA, Y.; KANEMATSU, Y.; ÔHASI, M.;KONDÓ, K. On the party coenzyme Q isolated from *Rhodotorula lactosa*, IFO 1058 and its relation to the taxonomic position. **Agriculture and Biological Chemistry**, Osaka, v.37, n. 3, p. 621-628, 1973.
- YAMADA, Y.; MITSUYOSHI, A.; KONDO, K. Coenzyme Q system in the classification of Apiculate Yeasts in the genera *Nadsonia*, *Saccharomycoses*, *Hanseniaspora*, *Kloeckera*, and *Wickerhamia*. **Journal of the General Applied Microbiology**, Washington, v.22, p. 293 - 299, 1976.
- YAMADA, Y.; NAGAHAMA, T. The molecular phylogeny of the ascomycetous yeast genus *Holleya* Yamada based on the partial sequences of 18s and 26s ribosomal RNAs. **Journal of the General and Applied Microbiology**, Washington, v. 37, n. 2, p. 199 - 206, 1991.
- YAMADA, Y.; NAKAGAWA, Y.; BANNO, I. The molecular phylogeny of the Q-10 equipped species of the Heterobasidiomycetous yeast genus *Rhodosporidium* Banno based on the partial sequences of 18s and 26s ribosomal acids. **Journal of the General Applied Microbiology**, Washington, v. 36, p. 435 - 444, 1990.
- YAMADA, Y.; NOJIRI, M.; MATSUYAMA, M.; KONDO, K. Coenzyme Q system in the classification of the Ascosporeogenous yeast genera *Debaromyces*,

Saccharomyces, and *Endomycopsis*. **Journal of the General Applied Microbiology**, Washington, v. 22, p. 325 - 337, 1976.

YAMADA, Y; ARIMOT, M. ; KONDÓ, K. Coenzyme Q system in the clasification of somo ascosporenous yeasts genera in the families *Saccharomycetaceae* and *spermophtaraceae*. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v.43, p. 65 - 71, 1977.

YAMASATO, K. ; GOTO, S.; OKWADA, K.; OKUNO, D.; ASSOKI, H. ; HIROSHI, I.. Yeasts from the Pacific ocean. **Journal of the General Applied Microbiology**, Washington, v. 20, p. 289-307, 1974.

YOSHIDA, M.; MAEDA, HISAO.; IFUKU, Y. Rapid detection of yeast in Orange Juice by enzyme - linked Immununosorbent assay. **Agriculture and Biological Chemistry**, Osaka, v. 55, n. 12, p. 2951 - 2957, 1991.

APÊNDICE 1: Meios de isolamento, local e coleta das leveduras identificadas.

Gênero	Espécie	Nº	meio		local de coleta			coleta	
		isolado	SAB. mod.	ML A	estuário	mangue	rio	1ª	2ª
Aureobasidium	pullulans	495		+	+				+
		500		+		+			+
Candida	atmosphærica	453		+	+				+
	bacarum	248		+			+		+
	boidini	496		+	+				+
		498		+	+				+
	bombi	25	+				+	+	
		27	+				+	+	
	citrea	80	+	+	+			+	
		82	+	+	+			+	
	famata	31		+			+	+	
		38		+		+		+	
		39		+	+			+	
		43		+		+		+	
	friedrichii	454		+	+				+
	fructus	287		+	+				+
	guilliermondii	42	+		+			+	
		85	+		+			+	
		491	+	+		+			+
	nitrativorans	37		+		+		+	
		243		+		+			+
	parapsilosis	245		+		+			+
	pintolopesii var.	36		+		+		+	
	pintolopesii	285	+				+		+
		291	+			+			+
		356	+				+		+
		502		+			+		+
	pseudointermedia	83	+	+	+			+	
	quercitrusa	41	+		+			+	
		48		+	nd	nd	nd	+	
		294		+			+		+
	sake	26	+				+	+	
		32		+		+		+	
		90		+			+	+	
		244		+		+			+
		87		+	+			+	
	sp.A	355	+						+
	sp B	295		+			+		+
	solani	503	+		+				+
	sonkii	246	+			+			+
	tannotolerans	290	+			+			+
	torresii	44		+		+		+	
		86		+	+			+	
	valida	84		+	+			+	
		486		+		+			+
		501	+		+				+

APÊNDICE 1: (CONTINUAÇÃO)

Gênero	Espécie	Nº	Meio		Local da coleta			coleta	
		isolado	SAB. mod.	ML A	Estuário	mangue	rio	1ª	2ª
Candida	versatilis	34	+			+		+	
		288	+		+				+
Cryptococcus	luteolus macerans	318	+				+		+
		249		+			+		+
Williopsis	saturnus	35	+			+		+	
		497	+		+				+
Kluyveromyces	aestuarii	286		+	+				+
		492		+		+			+
Rhodotorula	aurantiaca			+					
		40		+	+			+	
		129	+				+	+	
		241		+	+				+
	glutinis	242		+	+				+
		293		+			+		+
		296		+			+		+
	rubra	28		+			+	+	
		30		+			+	+	
	graminis	88		+	+			+	
Saccharomyces	exiguus	499	+				+		+
Sporobolomyces	roseus	33	+			+		+	
		89	+				+	+	
		289							+
Fellomyces	fuzhouensis	292	+			+			+
Trichosporon	asahii	21	+				+	+	
Zygosaccharomyces	microellipsoides	493		+		+			+

APÊNDICE 2: Código das culturas isoladas em água do rio Una do Prelado depositadas na Coleção de Cultura Tropical.

Gênero	Espécie	codigo inicial	código CCT
Aureobasidium	pullulans	495	3864
		500	4120
Candida	atmosphaerica	453	3898
	bacarum	248	3885
	boidini	496	3859
	bombi	498	3847
		25	3861
	citrea	27	3879
		80	3882
	famata	82	3890
		31	3839
		38	3884
		39	3844
	friedrichii	43	3873
		454	3860
		287	3858
	guilliermondii	42	3902
		85	3872
	nitrativorans	491	3877
		37	3896
		243	3868
	parapsilosis	245	3866
	pintolopesii var.	36	3841
	pintolopesii	285	3845
		291	3850
		356	3855
		502	3837
	pseudointermedia	83	3875
	quercitrusa	41	3881
		48	3897
	sake	294	3846
		26	3869
		32	3853
		90	3888
		244	3871
	sp.A	87	3887
		355	3856
	sp.B	295	3843
	solani	503	3878
	sonkii	246	3900
	tannotolerans	290	3891
	torresii	44	3904
		86	3870

APÊNDICE 2: (continuação)

Gênero	Espécie	Código inicial	Código da CCT
Candida	valida	84	3863
		486	3880
		501	3876
	versatilis	34	3894
		288	3862
Cryptococcus	luteolus	318	3854
	macerans	249	3905
Williopsis	saturnus	35	3886
		497	3901
Kluyveromyces	aestuarii	286	3874
		492	3852
Rhodotorula	aurantiaca	40	3849
		129	3838
		241	3840
		242	3883
	glutinis	293	3851
		296	3889
	rubra	28	3895
	graminis	30	3892
		88	3893
Saccharomyces	exiguus	499	3842
Sporobolomyces	roseus	33	3903
		89	3867
		289	3899
Fellomyces	fuzhouensis	292	3865
Trichosporon	asahii	21	3857
Zygosaccharomyces	microellipsoides	493	3848

APÊNDICE 3 - Mapa mostrando os limites da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, SP.

